

# **Analytik von CYP-Eicosanoiden und ihre Rolle bei ischämischem Organversagen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

<https://doi.org/10.18452/21298>

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplombiologe Maximilian Blum

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray

2. Prof. Dr. Michael Bader

3. Prof. Dr. Nils-Helge Schebb

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2020

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Eicosanoide als Metaboliten der ( $\omega$ -3)- und ( $\omega$ -6)-Fettsäuren	2
1.2 CYP-abhängige Eicosanoid-Bildung	6
1.3 Sekundärmetabolismus durch Epoxid-Hydrolasen	9
1.4 Rolle der CYP-Eicosanoide bei ischämischem Organschaden	10
1.5 Stereoisomerie von Eicosanoiden	14
1.6 Chirale Eicosanoid-Analytik	17
1.7 Zielsetzung	21
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Präparative Methoden	23
2.1.1 Präparation von Cyp4a12a-Mikrosomen aus Sf9-Insektenzellen	23
2.1.2 Präparation von Mikrosomen aus muriner Leber und Niere	23
2.1.3 Präparation cytosolischer, sEH-enthaltender Fraktionen aus Gewebe	24
2.1.4 Präparation von Eicosanoiden aus biologischen Proben	25
2.1.4.1 Gewinnung von Organhomogenaten	25
2.1.4.2 Präparation mittels alkalischer Hydrolyse	25
2.1.4.3 Präparation ohne Hydrolyse	26
2.1.4.4 Festphasenextraktion an Bond-Elut-Certify-II-Säule	26
2.2 Biochemische Methoden	27
2.2.1 Charakterisierung von Mikrosomen	27
2.2.1.1 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts	27
2.2.1.2 Bestimmung der NADPH-CPR-Aktivität	28
2.2.1.3 Proteinbestimmung nach Lowry	28
2.2.1.4 Bestimmung der CYP-Enzymaktivität	29
2.2.2 Bestimmung der Stereoselektivität von Epoxid-Hydrolasen	30
2.2.3 Stimulation von Vollblutproben mittels Calcium-Ionophor	31
2.2.4 Synthese von [1- $^{14}$ C]-Metaboliten der [1- $^{14}$ C]-Arachidonsäure	31



2.2.4.1	Synthese durch chemische Epoxidation	31
2.2.4.2	Enzymatisch katalysierte Synthese von 20-OH-EETs	32
2.2.4.3	Chemische Bildung von THETs durch saure Hydrolyse von HEETs	33
2.2.4.4	Kontrolle des Verschneidungsverhältnisses	34
2.3	Tierversuche	34
2.3.1	Untersuchungen des ischämischen Nierenschadens	34
2.3.1.1	Ischämie-Reperfusion (I/R) an Ratten <i>in vivo</i>	34
2.3.1.2	Ischämie der isolierten perfundierten Niere	35
2.3.2	Fütterungsversuche an gentechnisch veränderten Mäusen	38
2.4	Achirale Chromatografische Methoden	40
2.4.1	Allgemeines zur Analytik mit <sup>14</sup> C- und UV-Detektor	40
2.4.2	Verwendete Säulen und Methoden	40
2.4.3	Polysaccharidbasierte Chiralphasen-HPLC	41
2.4.4	Achirale Chromatografie mit Single-Quad-MS-Detektion	42
2.5	Chirale Chromatografie-gekoppelte Massenspektrometrie	43
2.6	Statistik	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Rolle der CYP-Eicosanoide bei ischämischem Organschaden	46
3.1.1	Akutes Nierenversagen: Modellversuche <i>in vivo</i>	47
3.1.2	Akutes Nierenversagen: Modellversuche <i>ex vivo</i>	52
3.1.3	CYP-Eicosanoide in humanem Plasma bei akutem Organversagen	56
3.1.4	Sekundärmetabolismus von CYP-Eicosanoiden bei akutem Organversagen	58
3.1.4.1	Inaktivierung von Monoepoxiden durch sEH	59
3.1.4.2	Bildung von 20-HEETs als Sekundärmetaboliten der HETEs und EETs bei ischämischem Organschaden	62
3.2	Ein neues Verfahren zur chiralen Analytik von Eicosanoiden mittels RP-LC-ESI-MS/MS	66
3.2.1	Auswahl geeigneter chiraler Säulen und Trennbedingungen	67
3.2.2	Säulenkopplung und Tandem-Massenspektrometrie	73
3.2.3	Validierung der chiralen LC-MS/MS-Analytik	76
3.2.3.1	Standards und Kalibrierung	77
3.2.3.2	Validierung chromatografischer Parameter	79
3.2.3.3	Akkuratesse und Präzision	82
3.2.3.4	Chromatografie in biologischen und klinischen Proben	84

3.3 Anwendung der Chiralphasen-Analytik auf biologische Fragestellungen	88
3.3.1 Stereoselektive Bildung von 17,18-EEQ und 18-HEPE durch CYP 1A1	88
3.3.2 Stereospezifitäten der löslichen und mikrosomalen Epoxid-Hydrolase	90
3.3.3 CYP-mEH-Interaktion und die Stereospezifität der mikrosomalen Bildung von Monoepoxiden	96
3.3.4 Bildung enantiomerer Monoepoxide bei sEH-KO-Mäusen in vivo	99
3.3.5 Chirale Eicosanoidanalyse in humanem Plasma	104
<b>4. Diskussion</b>	<b>107</b>
4.1 CYP-Eicosanoide als Modulatoren des akuten Nierenschadens	108
4.1.1 Eine Imbalance freier EETs und 20-HETE ist assoziiert mit I/R-Schaden in Rattennieren	108
4.1.2 Analyse des CYP-Eicosanoid-Profiles bei post-operativer AKI	110
4.1.3 Mechanismen der Wirkung von EETs und 20-HETE bei renalem I/R-Schaden	111
4.1.4 Sekundärmetabolismus beeinflusst endogene Level und die biologische Wirkung primär gebildeter CYP-Eicosanoide	113
4.2 Etablierung, Optimierung und Validierung chiraler Eicosanoid-Analytik	119
4.2.1 Validierung der Methode	120
4.2.2 Methodenspezifische Probleme und deren Lösung	121
4.3 Anwendung der Chiralphasen-Analytik der Eicosanoide auf biologische Fragestellungen	125
4.3.1 Stereospezifische Rolle von CYP-Eicosanoiden	125
4.3.2 Epoxid-Hydrolasen regulieren Monoepoxide stereospezifisch	126
4.3.3 CYPs bilden AA-Eicosanoide stereospezifisch	130
4.3.4 Die Bildung von 18-HEPE durch CYP1A1 und Stimulation humaner Blutproben ist stereoselektiv	131
4.4 Ausblick	132
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>134</b>
 <b>Abkürzungsverzeichnis</b>	 <b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>XII</b>
<b>Vorträge</b>	<b>XIII</b>
<b>Posterbeiträge</b>	<b>XIII</b>
<b>Danksagung</b>	<b>XIV</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>XV</b>

# **Zusammenfassung**

## **Hintergrund:**

Cytochrom P450 (CYP) Enzyme tragen zur Bioaktivierung von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei. Die gebildeten Monoepoxy- und Monohydroxy-Metaboliten werden zusammenfassend als CYP-Eicosanoide bezeichnet und fungieren als Mediatoren bei der Regulation des Gefäßtonus, der Herz- und Nierenfunktion, sowie einer Vielzahl weiterer physiologischer Prozesse. Prominente Vertreter der CYP-Eicosanoid-Familie sind die aus der Arachidonsäure gebildeten Epoxyeicosatriensäuren (EETs) und 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE). EETs und 20-HETE haben zum Teil gegensätzliche biologische Aktivitäten, die zur Aktivierung bzw. Inhibition antiinflammatorischer und weiterer Zell- und Organ-protectiver Signalwege beitragen.

## **Zielstellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Analyse endogener Metabolitenprofile zum besseren Verständnis der Rolle von CYP-Eicosanoiden bei der Entstehung von Ischämie/Reperfusion (I/R)-bedingten Organschäden beizutragen. Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

- (i) Bildung, Wirkung und Sekundärmetabolismus von EETs und 20-HETE in Tiermodellen des akuten Nierenversagens,
- (ii) Analyse möglicher Besonderheiten im CYP-Eicosanoid-Profil bei Patienten mit post-operativem Nierenversagen, und
- (iii) Entwicklung eines Verfahrens zur „Chiralen Lipidomik“ von Monoepoxy- und Monohydroxy-Metaboliten in biologischen und klinischen Proben.

## **Hauptergebnisse**

(i) Die Initiation des akuten Nierenversagens war im verwendeten Rattenmodell mit einer 8-10 fachen Erhöhung der freien renalen 20-HETE Konzentrationen assoziiert, während freie EETs infolge ihres raschen Abbaus durch Epoxidhydrolasen (EHs) nicht akkumuliert wurden. Der morphologische und funktionelle Nierenschaden konnte durch Gabe eines metabolisch stabilen EET-Analoges signifikant vermindert werden. Im Mausmodell führte das Ausschalten des Gens für die lösliche EH (sEH) zu keiner Verminderung des I/R-induzierten Nierenschadens. Im Vergleich zum Wildtyp lag bei den sEH-knockout Mäusen eine signifikant erhöhte renale 20-HETE Bildung vor, während der hydrolytische Abbau der EETs durch Ausschalten des sEH-Gens nur unvollständig unterdrückt war. 20-Hydroxyepoxyeicosatriensäuren (20-HEETs) als bisher wenig beachtete CYP-abhängige Sekundärmetaboliten von EETs und 20-HETE lagen endogen in erheblichen Menge vor und erhöhten sich I/R-bedingt signifikant.

(ii) Im Anschluss an eine klinische Studie wurden die Plasma CYP-Eicosanoid-Profile von Patienten verglichen, die nach einer offenen Herzoperation akutes Nierenversagen entwickelten (n=21) bzw. frei

von dieser Komplikation blieben (n=38). Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Bildung von 20-HETE und 8,9-EET in der Patientengruppe mit postoperativem akutem Nierenversagen.

(iii) Durch Kopplung von chiraler Reverse-Phasen Chromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie wurde ein neuartiges Verfahren entwickelt (chiral-LC-ESI-MS/MS), das die effektive Trennung und sensitive Messung der in biologischen Proben vorliegenden Vielfalt regio- und stereoisomerer Monoepoxy- und Monohydroxy-Metaboliten ermöglicht. Erste Anwendungsbeispiele zeigten die Eignung der Methode zur detaillierten Analyse der Stereospezifitäten von CYP-Enzymen und Epoxidhydrolasen. Erstmals wurde gefunden, dass die Ausschaltung des sEH-Gens *in vivo* zu spezifischen Veränderungen in der Enantiomeren-Zusammensetzung von Monoepoxy-Metaboliten führt. Beispielweise erhöhte sich das (*R,S*)/(*S,R*)-Verhältnis bei 14,15-EET von etwa 2:1 im Plasma von Wildtyp-Mäusen auf nahezu 10:1 bei sEH-knockout Mäusen. Untersuchungen an humanen und murinen Lebermikrosomen führten zu der bisher unbekannten Tatsache, dass die Enantiomeren-Zusammensetzung der NADPH-abhängig gebildeten Monoepoxy-Metaboliten durch eine enge Kopplung ihrer stereospezifischen Bildung durch CYP-Enzyme und ihres enantioselektiven Abbaus durch die mikrosomale EH bestimmt wird. In humanen Plasmaproben wurde gefunden, dass bei verschiedenen Monoepoxy-Metaboliten ein Enantiomerenüberschuss auftritt. Monohydroxy-Metaboliten liegen dagegen unter Basalbedingungen als Racemate vor. Ihre bekannte stereoselektive Bildung durch Lipoxygenasen (z.B. von 5(*S*)-, 12(*S*)-, 15(*S*)-HETE) und Cyclooxygenasen (11(*R*)-HETE) war jedoch nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor-Stimulation von Vollblutproben nachweisbar. Ein signifikanter Enantiomerenüberschuss trat auch bei der stimulierten Bildung von 18-Hydroxy-eicosapentaensäure (18-HEPE) auf, einem Vorläufer Entzündungs-auflösender Lipidmediatoren.

### **Schlussfolgerungen und Ausblick:**

Ein Ungleichgewicht in der Bildung von 20-HETE und EETs trägt zur Entstehung des I/R-induzierten Nierenschadens in den untersuchten Tiermodellen bei und ist möglicherweise auch ein Risikofaktor für das Auftreten von post-operativem akutem Nierenversagen bei Patienten. Pharmakologische Interventionen zur Hemmung der 20-HETE Bildung und/oder zur Verstärkung EET-abhängiger protektiver Mechanismen könnten als neuer Ansatzpunkt für Strategien zur Verhinderung des akuten Nierenversagens genutzt werden.

Das entwickelte Verfahren zur chiralen Lipidomik eröffnet neue Möglichkeiten zur Untersuchung der physiologischen und pathophysiologischen Rolle von bioaktiven Lipidmediatoren, deren Bildung und Wirkung im Allgemeinen mit hoher Regio- und Stereoselektivität erfolgt.

## **Abstract**

### **Background:**

Cytochrome P450 (CYP) enzymes contribute to the bioactivation of long-chain polyunsaturated fatty acids. The monoepoxy- and monohydroxy-metabolites generated by CYP enzymes are collectively termed CYP-eicosanoids. CYP-eicosanoids act as mediators in the regulation of vascular tone, heart- and kidney function and several further physiological processes. Arachidonic acid-derived epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) are prominent members of the CYP-eicosanoid family. EETs and 20-HETE show partially opposing biological activities that contribute to the activation or inhibition of anti-inflammatory and other cell- and organ-protective mechanisms.

### **Objectives:**

The present work has been aimed at analyzing endogenous metabolite profiles in order to better understand the role of CYP-eicosanoids in the development of ischemia-reperfusion (I/R)-induced organ damage. Specific tasks were as follows:

- a) To investigate the formation, action, and secondary metabolism of EETs and 20-HETE in animal models of acute kidney injury (AKI).
- b) To search for alterations in the circulating CYP-eicosanoid profile potentially associated with the development of AKI in patients undergoing cardiac surgery.
- c) To establish a “chiral lipidomics” approach for profiling enantiomeric monoepoxy- and monohydroxy-metabolites in biological and clinical samples.

### **Main results:**

- a) As revealed in a rat model, initiation of ischemic AKI was accompanied by an 8-10 fold increase of free renal 20-HETE levels, whereas free EETs were not accumulated, due to their rapid secondary metabolism by epoxide hydrolases (EH). Administration of a metabolically robust synthetic EET-analog significantly ameliorated I/R-induced morphological and functional kidney damage. In a mouse model, deletion of the soluble EH (sEH) gene did not reduce I/R-induced kidney injury. Compared with wildtype, sEH-knockout mice showed significantly increased renal 20-HETE formation, whereas the hydrolytic degradation of EETs was not completely suppressed. In both animal models, ischemia stimulated the release of 20-hydroxyepoxyeicosatrienoic acids (20-HEETs), a class of CYP-generated secondary metabolites of EETs and 20-HETE.
- b) Taking advantage of plasma samples available from a recently concluded clinical trial, circulating CYP-eicosanoid profiles were compared in patients who underwent open heart surgery with (n=21) and without (n=38) developing postoperative AKI. The results revealed significantly increased levels of 20-HETE and 8,9-EET in the postoperative AKI group.

c) Coupling chiral reversed-phase chromatography with tandem mass spectrometry resulted in a novel approach (chiral-LC-ESI-MS/MS) that allowed the effective separation and sensitive measurement of a wide variety of regio- and stereoisomeric monoepoxy- and monohydroxy-metabolites in biological samples. Applications showed suitability of the method for the detailed analysis of the stereospecificities of CYP and EH enzymes. It was found for the first time, that deletion of the sEH gene leads *in vivo* to specific alterations in the enantiomeric composition of monoepoxy-metabolites. For example, the (*R,S*)/(*S,R*)-ratio of circulating 14,15-EET changed from about 2:1 in wildtype to almost 10:1 in the sEH-KO mice. Studies with human and murine liver microsomes revealed that the enantiomeric composition of NADPH-dependently generated monoepoxy-metabolites is determined by a tight coupling between their stereospecific formation and enantioselective degradation, as catalyzed by CYP and microsomal EH enzymes, respectively. Analysis of human plasma showed significant enantiomeric excess with several monoepoxy metabolites. In contrast, monohydroxy metabolites were generally present as racemates under basal conditions.  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore stimulation of whole blood samples resulted in the well-known stereospecific formation of lipoxygenase- (e.g. 5(*S*)-, 12(*S*)-, 15(*S*)-HETE) and cyclooxygenase-dependent (e.g. 11(*R*)-HETE) monohydroxy-metabolites. After stimulation, a significant enantiomeric excess was also measured for 18-HEPE, a precursor of inflammation resolving lipid mediators.

### **Conclusions and perspectives:**

An imbalance in the formation of 20-HETE and EETs contributes to I/R-induced kidney injury in animal models and potentially also represents a risk factor for the development post-operative AKI in patients. Pharmacological interventions to inhibit 20-HETE formation and/or to reinforce EET-dependent protective mechanisms may provide novel strategies for the prevention of AKI. The established method of Chiral Lipidomics offers novel opportunities for investigating the physiological and pathophysiological roles of bioactive lipid mediators that generally exert their physiological functions in a highly regio- and stereospecific manner.

### **Key words:**

Acute kidney injury; oxylipins; CYP-eicosanoids; Inflammation; Reoxygenation; chiral high-performance liquid chromatography; tandem mass spectrometry; microsomal epoxide hydrolase; soluble epoxide hydrolase; stereoisomers

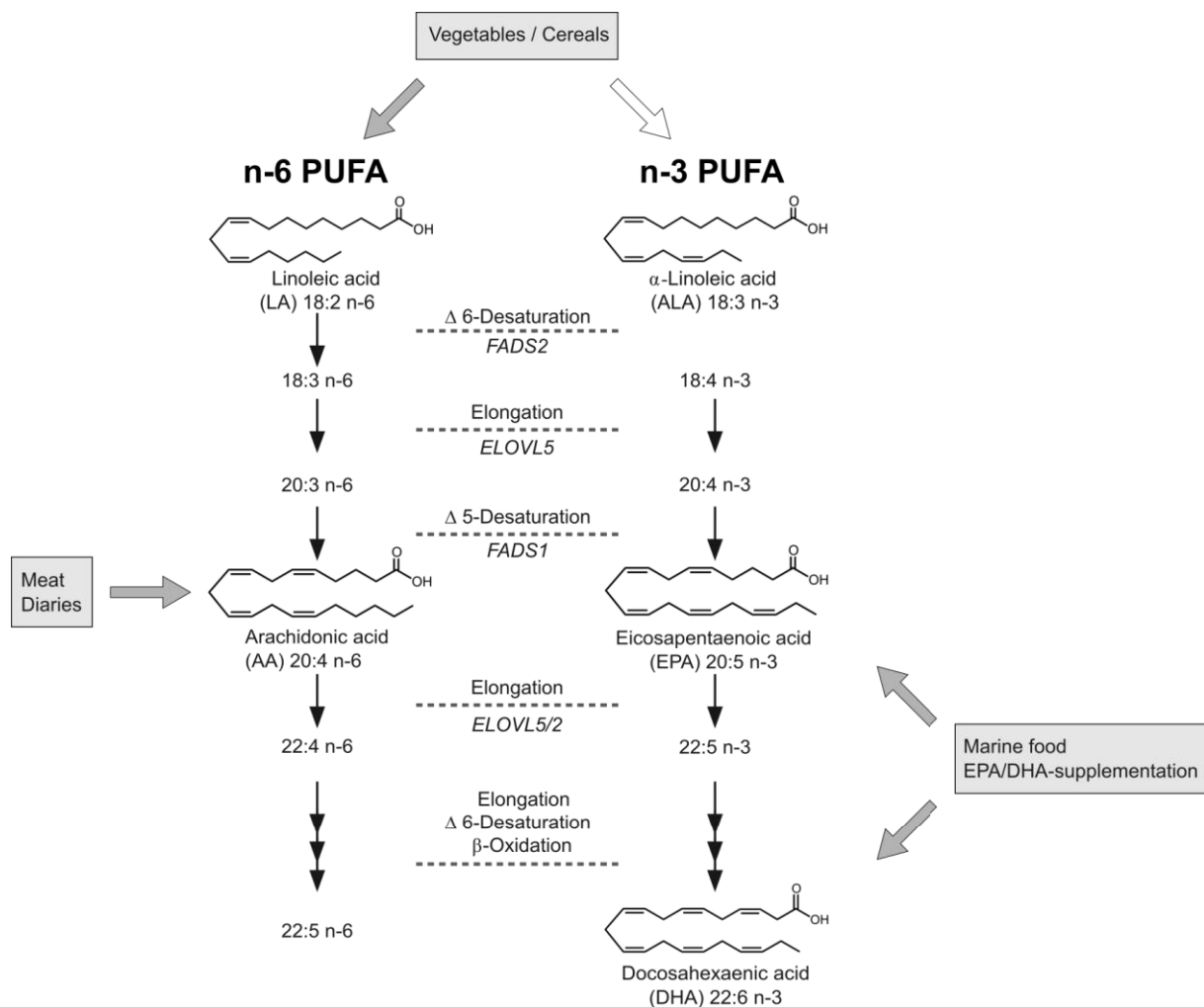
# **1. Einleitung**

## **1.1 Eicosanoide als Metaboliten der ( $\omega$ -3)- und ( $\omega$ -6)-Fettsäuren**

Zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids; PUFAs) zählen C18, C20 und C22-Verbindungen, die wichtige Bestandteile zellulärer Membranen sind und insbesondere als Precursor der Eicosanoide eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion spielen. Sie liegen vorwiegend in Phospholipiden verestert vor und weisen in der Kohlenwasserstoffkette zwei bis sechs Kohlenstoffdoppelbindungen (ungesättigte Loki) auf. Die Entfernung der letzten Doppelbindung von der terminalen Methylgruppe aus betrachtet wird mit  $\omega$ -x angegeben, während die Position einer Doppelbindung beginnend an der Carboxylgruppe gezählt mit  $\Delta$ x bezeichnet wird. Säugetieren und dem Menschen fehlen die Enzyme, die zum Einfügen einer Doppelbindung hinter der  $\Delta$ 9-Position erforderlich sind – die endogene Synthese ungesättigter Fettsäuren endet daher mit der Ölsäure (18:1 $\omega$ -9). Die für die Körperfunktion benötigten langkettigen  $\omega$ -6-PUFAs müssen mit der Nahrung aufgenommen werden, sie stellen essentielle Fettsäuren dar. Noch früher in der Evolution ging die Fähigkeit verloren,  $\omega$ -3-PUFAs endogen zu bilden. Von diesem Unvermögen sind die meisten tierischen Organismen, und Chordatiere generell betroffen. Allerdings können im menschlichen Organismus die verschiedenen essentiellen PUFAs auch endogen gebildet werden, sofern die dafür benötigte C18-Vorstufe Linolsäure (18:2 $\omega$ -6) beziehungsweise  $\alpha$ -Linolensäure (18:3 $\omega$ -3) mit der Nahrung aufgenommen wurde [1]. Auf diese Weise entstehen durch Desaturation und Elongation – wenn auch nur mit begrenzter Enzymaktivität – weitere PUFAs wie Arachidonsäure (AA; 20:4 $\omega$ -6), Eicosapentaensäure (EPA; 20:5 $\omega$ -3) und Docosahexaensäure (DHA; 22:6 $\omega$ -3). Die Bildung einer ( $\omega$ -3)-PUFA aus ( $\omega$ -6)-PUFA ist dabei grundsätzlich nicht möglich. Die entsprechenden Bildungswege sind in Abbildung 1-1 dargestellt. Während Vorstufen langkettiger ( $\omega$ -6)-PUFAs durch industrielle Landwirtschaft zur Erzeugung Linolsäure-reicher Gemüse- und Getreidesorten vermehrt mit der Nahrung aufgenommen werden und zusätzlich AA bei fleischreicher Ernährungsweise – oft als „western diet“ bezeichnet –, ist der Anteil aufgenommener ( $\omega$ -3)-PUFAs nur gering:  $\alpha$ -Linolensäure kommt in Produkten bestimmter Pflanzen, etwa Lein-, Hanf-, Rapsöl oder Nüssen in größerer Menge vor. EPA und DHA werden primär vorwiegend von Meeresalgen gebildet. Der Nahrungskette folgend weisen somit auch Meerestiere einen erhöhten Gehalt auf. Die Ernährungsweise, aber auch die individuell ausgeprägten Enzymaktivitäten sind somit entscheidend für die Verfügbarkeit der verschiedenen ( $\omega$ -6)- und ( $\omega$ -3)-PUFAs bei Säugetieren und dem Menschen (Abbildung 1-1).

Den essentiellen ( $\omega$ -3)-PUFAs, beziehungsweise deren Metaboliten, wird im Allgemeinen eine entzündungshemmende, durchblutungsfördernde und kardioprotektive Wirkung zugesprochen [2]. Die Rolle der ( $\omega$ -6)-PUFAs ist hingegen ambivalent. Ein Zusammenhang von Nahrungsquelle, ( $\omega$ -3)-PUFAs und Protektion vor Herzerkrankungen wurde erstmals an grönländischen Inuit in den 1970er Jahren beschrieben [3] und bestätigte sich unter anderem eindrucksvoll bei EPA-supplementierten Patienten [4].





### Abbildung 1-1 Aufnahme und Metabolismus der PUFAs bei Säugetieren und dem Menschen

Werden die essentiellen Fettsäuren  $\omega$ -6 (n-6)-Linolensäure und  $\omega$ -3 (n-3)- $\alpha$ -Linolensäure aufgenommen, können daraus mittels Enzymen zur Kettenverlängerung und Einfügen weiterer Doppelbindungen in der Kohlenwasserstoffkette (Elongation und Desaturation) weitere PUFAs endogen gebildet werden. Die Kaskaden der  $\omega$ -6- und  $\omega$ -3-Fettsäuren bleiben dabei stets getrennt voneinander. Die gebildeten PUFAs werden vielfach direkt mit der Nahrung aufgenommen, AA ist beispielsweise reichlich in Fleisch enthalten.  $\alpha$ -Linolensäure kommt dagegen vorwiegend in den Ölen pflanzlicher Früchte vor, EPA und DHA treten in Meerestieren und –Algen in erhöhter Menge auf. Die endogene Bioverfügbarkeit dieser  $\omega$ -3-PUFAs wird wesentlich durch das  $\omega$ -6/ $\omega$ -3-Verhältnis bestimmt und ist im Falle Fleisch- und Linolensäure-reicher Essgewohnheiten ungünstig hoch ausgeprägt. Abbildung verändert nach [5].

Für die biologische Wirkung der PUFAs sind neben direkten Effekten auf Membranfunktionen und die Genexpression [6] im Wesentlichen die *Eicosanoide* verantwortlich [7]. Dabei handelt es sich um ein- oder mehrfach oxidierte Metaboliten langkettiger PUFAs. (Weil der Begriff im engeren Sinne nur C20-Metaboliten beschreibt, häufig aber auch C18- und C22-Verbindungen gemeint sind, ist im Schrifttum zunehmend der alternative Begriff *Oxylipine* für diese Metaboliten in Gebrauch. In der vorliegenden Arbeit bleibt hingegen die Rede von *Eicosanoiden* im

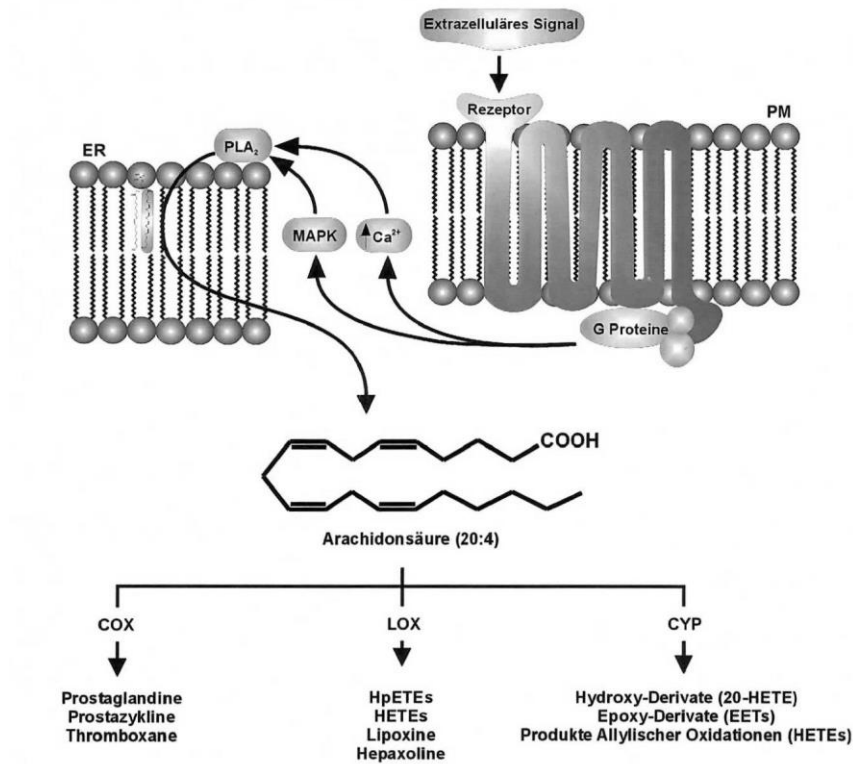
weiteren Sinne.) Ausgangspunkt der enzymatischen Eicosanoid-Bildung ist meist ein extrazelluläres, (patho)physiologisches Signal, das eine Freisetzung der in Phospholipiden in Sn-2-Position veresterten PUFAs bewirkt. Die Deesterifizierung erfolgt durch Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), von denen signalabhängig unterschiedliche Isoformen aktiviert werden. Während die cytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Freisetzung insbesondere von AA katalysiert [8], liegt der Freisetzung von DHA ein anderer, Ca<sup>2+</sup>-unabhängiger Mechanismus unter Beteiligung weiterer PLA<sub>2</sub>-Isoformen zugrunde [9]. Die Freisetzung der PUFAs bewirkt, dass sie für oxygenierende Enzyme zugänglich sind. Unabhängig davon, kann an PUFAs auch eine unspezifische chemische Oxidation auftreten. Abbildung 1-2 gibt eine schematische Übersicht über den Mechanismus der PUFA-Freisetzung. Für die enzymatische Bildung der Eicosanoide sind drei Wege beschrieben. Cyclooxygenasen (COX) und Lipxygenasen (LOX) wirken an den Fettsäuren als Dioxygenasen, wobei als Isoformen COX-1 und COX-2, sowie mehrere LOX-Isoformen mit jeweils unterschiedlicher Substratspezifität und Produktselektivität aktiv sein können [10, 11]. Die Zweifachoxidation durch COX hat einen Ringschluss im Molekül zufolge, wobei die Eicosanoidklassen der Prostaglandine und sekundär Thromboxane und Prostacycline entstehen. Bei der Reaktion kann alternativ ein instabiles Hydroperoxid gebildet werden, das nachträglich wieder reduziert wird, sodass einfach oxidierte Eicosanoide entstehen. Auf diese Weise werden durch LOX und COX verschiedene Monohydroxide und Leukotriene gebildet, die in sekundären Reaktionen zu mehrfach oxidierten Verbindungen wie Resolvine und Lipoxine metabolisiert werden können. Eine dritte, erst in jüngerer Vergangenheit aufgeklärte enzymatische Kaskade der PUFAs ergibt sich aus der Metabolisierung durch Cytochrom P450 (CYP)-Monooxygenasen [5, 12, 13]. Diese Enzyme bilden Monohydroxide und Monoepoxide auf direktem Wege, wie in Abschnitt 1.2 ausführlicher betrachtet wird.

Welche Eicosanoide tatsächlich bioverfügbar sind, hängt somit nicht nur von der Menge der jeweiligen PUFAs ab. Wesentliche Einflussfaktoren sind außerdem, ob und welche PLA<sub>2</sub>-Isoformen aktiv sind, welche PUFA-metabolisierenden Enzyme und Enzym-Isoformen mit jeweils individueller Substratspezifität und Produktselektivität vorliegen, und wie schnell die gebildeten Eicosanoide durch Re-Esterifizierung in Membranen gespeichert oder durch Sekundärmetabolismus derivatisiert werden.

Eicosanoide werden oft gewebs- oder zellspezifisch gebildet und wirken als intrazelluläre Signalmoleküle. Primäre Targets sind zumeist G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und Transkriptionsfaktoren [13] (vgl. Abschnitt 1.4). Es erfolgt zudem auch eine Freisetzung der Eicosanoide aus den Zellen über ABC-Transporter, sodass sie eine hormonartige Wirkung entfalten können. Sie werden von anderen Zellen über SLC-Transporter wieder aufgenommen [14]. In Endothel gebildete Monoepoxide wirken nach Freisetzung auf benachbarte Muskelzellen [15]. Für sekundäre Eicosanoide wie die Resolvine und Lipoxine wurden transzelluläre Synthesewege beschrieben [16].

Die biologische Wirkung der Eicosanoide ist vielfältig und gewebsspezifisch. Seit langen ist sie in Bezug auf den Immunstatus und die Herz-Kreislauf-Funktion bekannt, was zur Entwicklung zahlreicher Medikamente führte, die die Aktivität der beteiligten Enzyme oder deren Metaboliten

modifizieren. Das bekannteste Beispiel ist Aspirin, das aufgrund seiner antithrombotischen, schmerz- und entzündungshemmenden Wirkung im 19. Jahrhundert das weltweit erste industriell hergestellte Medikament war. Der Wirkmechanismus als Inhibitor der COX-Enzyme konnte 1971 aufgeklärt werden [17].

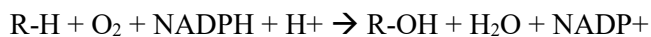


### Abbildung 1-2 Freisetzung von PUFAs und Metabolisierung zu Eicosanoiden

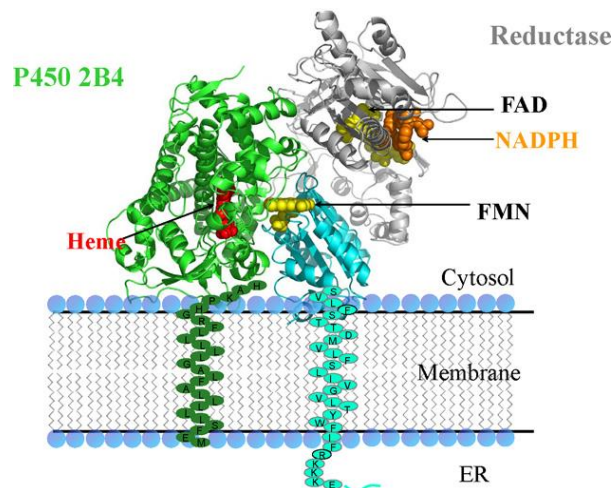
Über ein extrazelluläres Signal verschiedener Hormone oder Wachstumsfaktoren wird die Freisetzung (gezeigt am Beispiel von Arachidonsäure) aus ER- und Kernmembranen induziert. Ein G-Protein gekoppelter Rezeptor in der Plasmamembran empfängt das Signal und aktiviert durch Phosphorylierung die cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>). Diese bindet  $Ca^{2+}$  und transloziert zur Kernmembran oder zum ER. cPLA<sub>2</sub> kann auch durch andere Kinasen wie MAPK aktiviert werden. Durch Spaltung der Esterbindung von AA wird diese aus der Membran frei und für COX, LOX, und CYP-Enzyme zugänglich. Einige LOX-Enzyme können PUFAs jedoch auch in veresterter Form metabolisieren. Die Eicosanoide selbst werden teilweise wieder in den Doppelmembranen verestert und somit gespeichert, sodass sie bei erneuter Lipaseaktivität von diesen direkt freigesetzt werden. Die Esterspaltung erfolgt auch durch andere PLA<sub>2</sub>-Isoformen, sowie durch andere Enzymkaskaden, wie die der Phospholipase C und Diacylglycerollipase (nicht dargestellt). Abbildung entnommen aus [18].

## 1.2 CYP-abhängige Eicosanoid-Bildung

In der Enzymnomenklatur der NC-IUBMB sind Cytochrom P450 (CYP) -Enzyme als EC 1.14.14.1 (unspezifische Monooxygenase) erfasst. Sie sind in nahezu allen Organismen der phylogenetischen Skala verbreitet [6] und wurden erstmals als Kohlenmonoxid-bindende Pigmente in Lebermikrosomen von Ratten und Schweinen beschrieben [1, 2]. Beträgt die Aminosäure-Sequenzhomologie mehr als 40%, werden die verglichenen CYPs einer Familie, bei über 55% einer gemeinsamen Unterfamilie zugeordnet. Am Beispiel „CYP2C23“ lautet die Familie „2“ und die Unterfamilie „C“. Die Zahl „23“ steht für den 23. entdeckten Vertreter dieser Subfamilie. Die Diversität ist groß, beim Menschen sind 57 verschiedene Gene gefunden worden. Murine Cyp Proteine werden als Besonderheit kleingeschrieben. Strukturelle Gemeinsamkeit der etwa 50 kDa schweren Enzyme ist ein Eisen - Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe. Die Monooxygenase-Reaktion lässt sich vereinfacht wie folgt zusammenfassen:



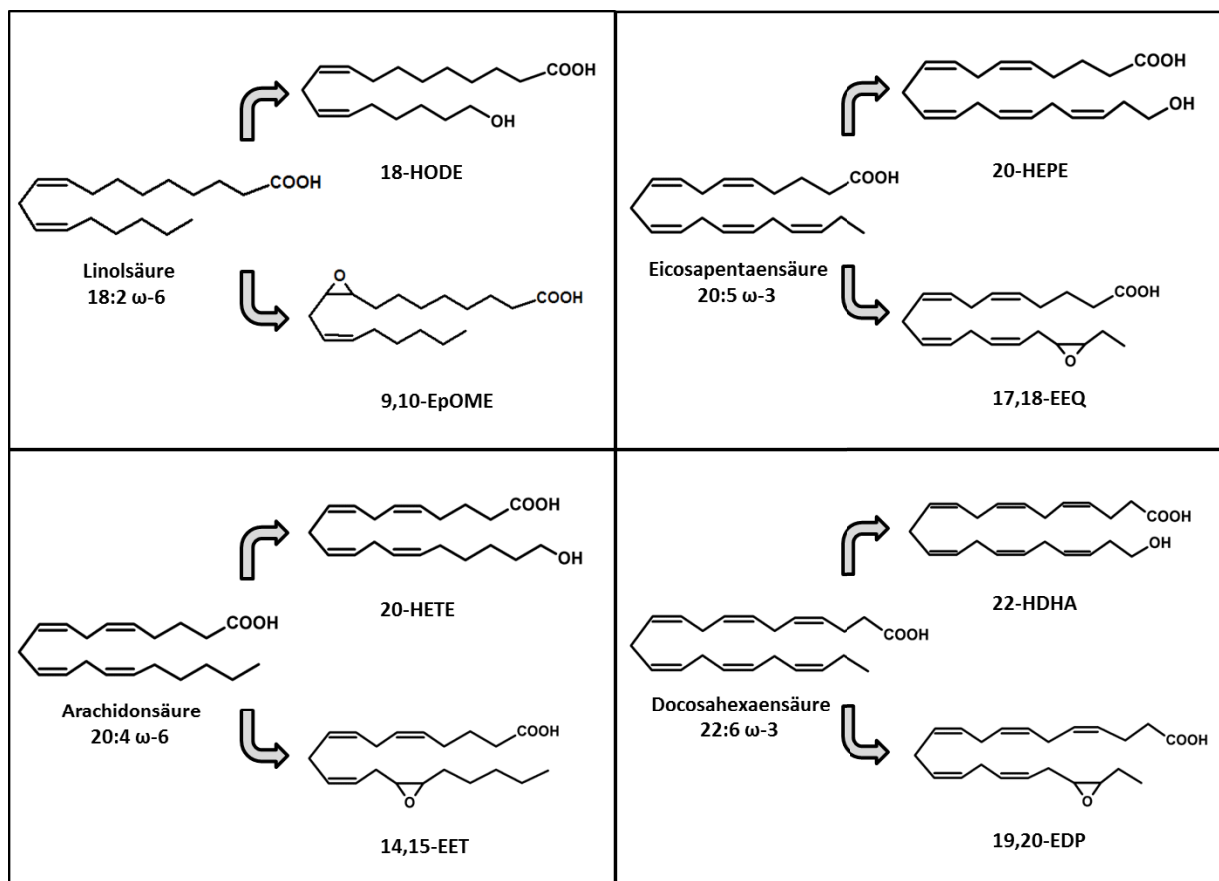
Für die gerichtete Reaktion werden Leitsysteme benötigt, die die hochreaktiven Elektronen in Einzel-Elektron-Schritten vom Donor in das katalytische Zentrum der CYPs steuern. Bei den meisten Eukaryoten liegt ein Zweikomponentensystem mit der NADPH-CYP Reduktase (CPR) vor, ein entsprechendes Modell ist in Abbildung 1-3 wiedergegeben.



**Abbildung 1-3 Zweikomponentensystem aus CYP und CPR am ER der Eukaryoten**

Dargestellt ist die Lokalisation des CYP-Systems bei Eukaryoten am Beispiel von CYP2B4. Sowohl CYP als auch CYP-Reduktase sind N-Terminal in der ER-Membran verankert, wobei sich der katalytisch aktive Bereich der Enzyme auf cytosolischer Seite befindet. Der Elektronentransportweg kann recht anschaulich nachvollzogen werden. Er verläuft von NADPH über FAD und FMN der Reduktase-Komponente zum Hämeisen der CYP-Komponente. Das Substrat, zum Beispiel AA, kann durch die PLA<sub>2</sub> direkt aus der Membran des ER herausgelöst werden. Abbildung entnommen aus [19].

Neben den in Abschnitt 1.1 angeführten LOX und COX-Enzymen, spielen CYPs als Monooxygenasen bei der Bildung von Eicosanoiden eine entscheidende Rolle, die jedoch erst ab den 1980er Jahren erforscht wurde [20, 21]. CYPs der 4A- und 4F-Familie sind typische Monohydroxylasen, wobei die Hydroxylgruppe vorwiegend in  $\omega$ -Position (terminal) eingefügt wird. Wie aus Abbildung 1-4 hervorgeht, werden abhängig vom Substrat (Linolsäure, AA, EPA, DHA) Hydroxyoktadekadiensäuren (HODEs), Hydroxyeikosatetraensäuren (HETEs), Hydroxyeikosapentaensäuren (HEPEs) oder Hydroxydokosahexaensäuren (HDHAs) gebildet. Andere CYP-Familien (2C, 2J) monooxygenieren eine *cis*-konfigurierte Doppelbindung in der PUFA-Kette zu einem Epoxid, wobei entsprechend Epoxyoktadekensäuren (EpOMEs), Epoxyeikosatriensäuren (EETs), Epoxyeikosatetraensäuren (EEQs) oder Epoxydokosapentaensäuren (EDPs) entstehen. Die Regioselektivität der verschiedenen CYPs ist unterschiedlich ausgeprägt, wobei prinzipiell alle auftretenden Doppelbindungen in den PUFAs epoxidiert werden können. Einige CYPs wie 1A1, 2E1 oder 4F12 sind weniger spezifisch und katalysieren sowohl die Epoxid- als auch Hydroxidbildung, wobei die Hydroxylierung in dem Fall stets subterminal in  $\omega$ -1- bis  $\omega$ -4-Position auftritt [5].

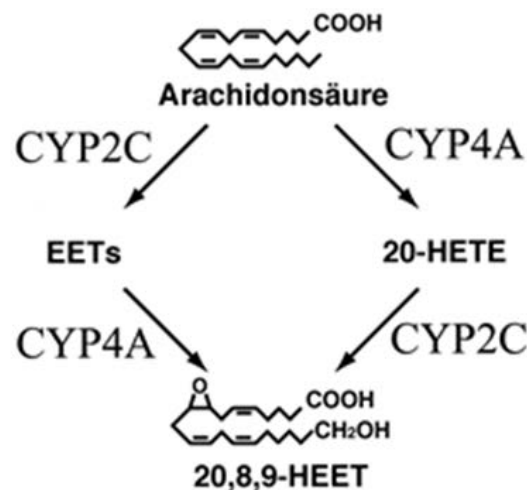


**Abbildung 1-4 CYP-vermittelte Bildung von Monohydroxiden und Monoepoxiden aus PUFAs**

Die Bildung von Eicosanoiden aus PUFAs durch CYP-katalysierte Monooxygenierung ist beispielhaft gezeigt für jeweils ein Regioisomer gebildeter Monohydroxide und Monoepoxide aus den Fettsäuren Linolsäure, AA, EPA und DHA. CYPs können darüber hinaus weitere PUFAs als Substrate nutzen. Ein dritter, wenig erforschter Reaktionsweg stellt die bisallylische Hydroxylierung von PUFAs durch CYPs dar [22].

Die Eicosanoide selbst stellen wiederum Substrate für CYPs dar, wobei zahlreiche Derivate unterschiedlicher Chemie entstehen, die nur wenig erforscht sind. Zu den besser untersuchten Metaboliten zählen die 20-Hydroxyepoxyeikosatriensäuren (20-HEETs), die aus AA abgeleitet sind. Wie Abbildung 1-5 veranschaulicht, können sie auf zwei Wegen sowohl durch die Hydroxylierung von EETs als auch durch Epoxidierung von HETEs entstehen [23]. CYPs weisen teilweise eine bemerkenswert große Substrataffinität für Eicosanoide auf. Sie ist für Cyp4a12a bei EETs und für CYP2C23 bei 20-HETE größer als in Bezug auf AA [24]. 20-HEETs können als Abbauprodukt von EETs und 20-HETE aufgefasst werden, sie weisen jedoch ebenfalls eine biologische Aktivität auf, die jener der EETs teilweise übereinkommt (vgl. Abschnitt 1.4). Weitere Formen der HEETs werden durch LOX-Enzyme gebildet, wie beispielsweise die als *HEETAs* und *Hepolixine* bezeichneten Eicosanoide.

Der Sekundärmetabolismus von LOX- und COX-abhängigen Eicosanoiden durch CYPs ist weitgehend unerforscht, während für CYP-Eicosanoide, die sekundär von LOX und COX umgesetzt werden, verschiedene Beispiele beschrieben wurden, etwa EETs und 20-HETE als Substrate für COX [25-27] und der LOX-abhängige Metabolismus von 17,18-EEQ [28]. Die große Diversität der CYP-Eicosanoide veranschaulicht sich anhand weiterer biologisch auftretender PUFAs wie Adrenic acid 22:4 $\omega$ -6 oder  $\alpha$ -Linolensäure 18:3 $\omega$ -3, die ebenfalls Substrate für CYPs darstellen und biologisch aktive Eicosanoide hervorbringen [5].



#### Abbildung 1-5 Zwei Wege der Bildung von 20-HEETs

Aus AA werden über zwei verschiedene Wege HEETs in jeweils zwei Oxygenierungsreaktionen gebildet, wobei daran stets sowohl Epoxygenasen als auch Hydroxylasen der CYP-Familien 2C und 4A beteiligt sind. Für Cyp4a12a und CYP2C23 konnte eine hohe Aktivität der HEET-Bildung aus EETs beziehungsweise 20-HETE nachgewiesen werden. Neben Regioisomeren mit Epoxy-Gruppen an einer der vier ungesättigten Kohlenstoffbindungen, können auch subterminal hydroxylierte Verbindungen wie beispielsweise 19-HEETs CYP-abhängig gebildet werden (nicht dargestellt).

### **1.3 Sekundärmetabolismus durch Epoxid-Hydrolasen**

Die vorwiegend CYP-abhängig gebildeten Monoepoxy-Eicosanoide sind vergleichsweise instabile Verbindungen. Der heterozyklische Dreiring neigt zur hydrolytischen Spaltung. Biologisch entscheidend sind Epoxid-Hydrolasen, die die Ringspaltung katalysieren, im Ergebnis entstehen vizinale Diole. In hydrophoben Doppelmembranen verestert, werden Epoxide in Zellen gespeichert [29], hier sind sie chemisch stabiler und unzugänglich für die Hydrolasen. Die Epoxid-Spaltung ist biologisch von großer Bedeutung, da Epoxy-Eicosanoide als zumeist protektive zelluläre Signalmoleküle fungieren, während deren Diole in der Regel biologisch inaktiv sind (vgl. Abschnitt 1.4). Die Diole können – anders als 20-HEETs – mit einigen Ausnahmen als Abbauprodukte der Epoxide aufgefasst werden. Pharmakologisch werden daher die Entwicklung von Hydrolase-Inhibitoren [30], sowie die Herstellung von Epoxid-Analoga angestrebt, die kein Substrat für Hydrolasen darstellen [31]. Weitere Inaktivierungswege von Eicosanoiden stellen Reesterifizierung in Membranen [29, 32], Kettenverlängerung und Katabolismus ( $\beta$ -Oxidation) dar [13].

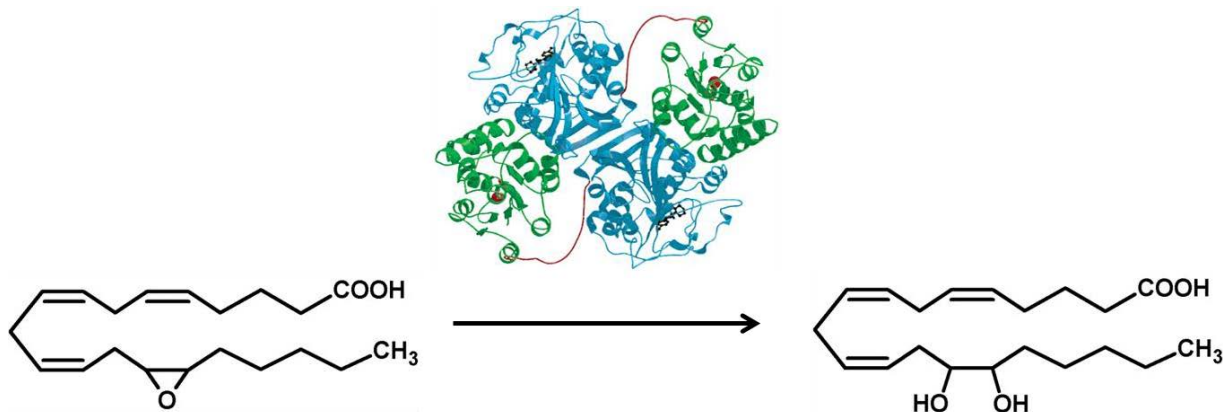
Es sind mehrere Epoxid-Hydrolasen beschrieben, von denen der löslichen Epoxidhydrolase (sEH) die größte biologische Bedeutung und Aufmerksamkeit in der Eicosanoid-Forschung zukommt. Die sEH wird konstitutiv ausgehend vom Gen *EPHX2* exprimiert und kommt ubiquitär, jedoch vor allem in Leber, Niere und dem Endothel vor [33]. Auch das Protein bedarf keiner Aktivierung, sondern liegt permanent in freier, aktiver Form vor.

Das Homo-Dimer der sEH besitzt jeweils zwei aktive Zentren mit Epoxid-Hydrolase- sowie Phosphataseaktivität, die mechanistisch voneinander getrennt sind. Abbildung 1-6 zeigt ein Modell der Tertiärstruktur und der aktiven Zentren. Da sEH kardioprotektive Epoxy-Eicosanoide wie 14,15-EET mit hoher Aktivität hydrolysiert, wurde das Enzym Gegenstand der Erforschung verschiedener Behandlungsstrategien von Herz-Kreislaufkrankungen (vgl. Abschnitt 1.4).

Vorwiegend in der Leber wird eine weitere, membrangebundene Epoxid-Hydrolase exprimiert, die mikrosomale Epoxid-Hydrolase (mEH), welche im Gen *EPHX1* codiert ist. Sie ist vorwiegend für die Hydrolyse von Xenobiotika und Abbauprodukten der Proteine und Nucleinsäuren zuständig. Aufgrund vergleichsweise geringer Aktivität *in vitro*, wurde der mEH eine unbedeutende Rolle in Bezug auf die Hydrolyse von Epoxy-Eicosanoiden zugesprochen. In jüngster Vergangenheit wurde jedoch eine Assoziation der mEH mit CYPs in Membranen beobachtet, die einen privilegierten Zugang zu Epoxid-Substrat nahelegt [34]. Es sind weitere Epoxid-Hydrolasen *EPHX3* und *EPHX4* gefunden worden, für jedoch bisher keine relevante Expression oder biologische Aktivität in Leber, Niere oder Endothel von Säugetieren und Menschen beschrieben wurde [35].

Die von entsprechenden Hydrolasen katalysierte, jedoch auch chemisch auftretende Bildung der Diole aus den Epoxiden ist beispielhaft in Abbildung 1-6 dargestellt. EETs werden zu Dihydroxyeikosatriensäuren (DHETs), EEQs zu Dihydroxyeikosatetraensäuren (DiHETEs), EDPs zu Dihydroxydokosapentaensäuren (DiHDPAs) und EpOMEs zu Dihydroxyoktadekensäuren

(DiHOMEs) hydrolysiert. Letztere Reaktion ist für die sEH besonders typisch, das Verhältnis aus EpOMEs und DiHOMEs wird daher häufig gebildet, um eine Aussage über die sEH-Aktivität in biologischen Proben zu treffen. Bevorzugte Regiosiomere der sEH von Linolsäure, AA, EPA und DHA abgeleiteten Eicosanoiden sind 9,10-EpOME, 14,15-EET, 14,15-EEQ und 13,14-EDP [36]. Auch sekundäre Epoxy-Eicosanoide werden von den Epoxid-Hydrolasen angegriffen, so entstehen aus den HEETs die Trihydroxyeikosatriensäuren (THETs).



**Abbildung 1-6 Hydrolyse von Epoxy-Eicosanoiden**

Die Hydrolyse der Epoxy-Eicosanoide erfolgt chemisch oder enzymatisch katalysiert durch Epoxid-Hydrolasen. Die Bildung des vizinalen Diols ist am Beispiel der Hydrolyse von 14,15-EET zu 14,15-DHET gezeigt. Die lösliche Epoxidhydrolase sEH liegt als 120 kDa großes Homo-Dimer frei im Cytosol vor. Schwarz markiert ist der sEH-Inhibitor N-cyclohexyl-N'-(iodophenyl)urea (CIU), dessen Anlagerung in der Tasche der Epoxid-Hydrolaseaktivität erfolgte. Die roten Punkte bezeichnen die Regionen der Phosphataseaktivität. Die N-terminale Domäne ist grün-, die C-terminale Domäne blau markiert. Die prolinreichen Verbindungssegmente der beiden Monomere sind rot dargestellt. Abbildung der Tertiärstruktur entnommen aus [37].

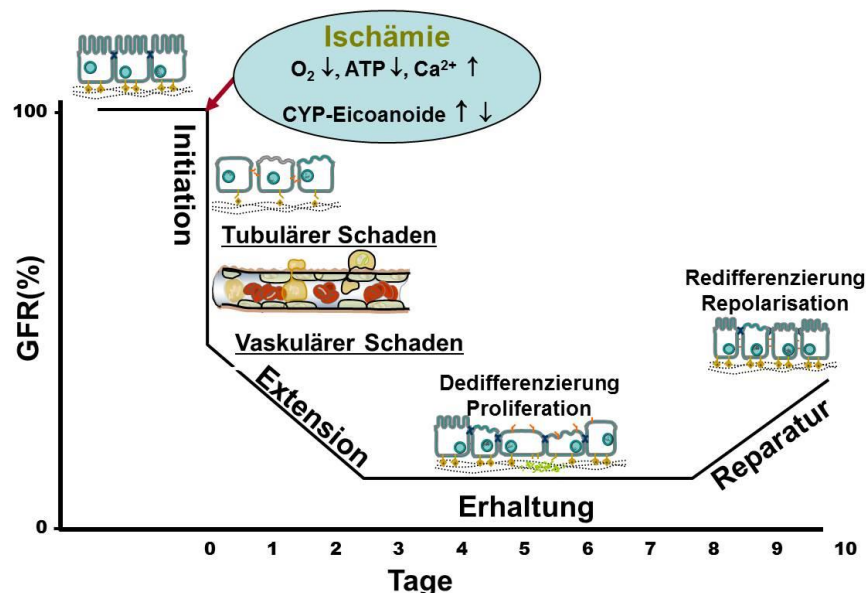
## 1.4 Rolle der CYP-Eicosanoide bei ischämischem Organschaden

Eicosanoide werden in fast allen Organen und Geweben gebildet und übernehmen bei differenzierten Lebewesen oft gewebspezifische Funktionen. In der Regel bewirken sie die Modulation von GPCRs, Ionenkanälen, Transkriptionsfaktoren oder von mitogen aktivierten Proteinkinasen. Die unmittelbaren Rezeptoren der CYP-Eicosanoide sind jedoch weitgehend unbekannt [13], lediglich für 20-HETE konnte kürzlich GPR75 als Rezeptor identifiziert werden, der jedoch vorwiegend in Lunge und Gehirn exprimiert wird [38]. CYP-Eicosanoide spielen unter anderem eine Rolle bei der Regulation des Blutdrucks, des Immunstatus und der Förderung der Salzausscheidung. Monoepoxide wirken blutdrucksenkend, vasodilatatorisch, antiinflammatorisch, schmerzlindernd, angiogen und teilweise (EETs) proliferierend auf Tumore [39]. Weniger einheitlich ist die Wirkung der CYP-Monohydroxide: Während 20-HETE blutdrucksteigernd, vasokonstriktiv,



proinflammatorisch und somit vielfach antagonistisch zu Monoepoxiden wirkt [40, 41], sind für subterminale Monohydroxide wie 19-HETE und 16-HETE vasodilatatorische Effekte und eher protektive Eigenschaften beschrieben [42]. Über die biologische Wirkung der von CYPs gebildeten  $\omega$ -3-Monohydroxide wie 20-HEPE und 22-HDHA ist bislang nur wenig bekannt [43]. Im Folgenden wird die Rolle der CYP-Eicosanoide bezogen auf ischämische Organschäden betrachtet.

Ischämischer Organschaden resultiert aus einem pathophysiologischen Zustand, bei dem im Organismus lokal oder global eine Einschränkung der Sauerstoffversorgung (Hypoxie) eintritt; begleitet von Mangelversorgung mit Nährstoffen und gestörter Beseitigung von Stoffwechselprodukten. Ursachen dafür können eine eingeschränkte Herzfunktion, Verengung oder Verschluss arterieller Blutgefäße, abgesunkener Sauerstoffgehalt des Blutes oder Blutverlust sein. Auch bei operativen Eingriffen tritt häufig Ischämie auf, insbesondere bei Herzoperationen und Organtransplantation. Ischämischer Organschaden ist eine wesentliche Ursache für Erkrankungen von zentraler Bedeutung, wie akutes Nierenversagen (AKI), Herzinfarkt und Schlaganfall [44]. Der Organschaden verstärkt sich durch die gegebenenfalls folgende Reoxygenierungsphase (Reperfusion) noch weiter, wie in Abbildung 1-7 am Beispiel der Niere gezeigt. Zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen sind neben der Analyse klinischer Proben verschiedene Tiermodelle



**Abbildung 1-7 Phasen der I/R am Beispiel der Niere**

Bei akutem ischämischem Nierenversagen (ARF) führt initial ein kurzzeitiges Ischämie-Ereignis zu einer starken Beeinträchtigung der Nierenfunktion, gezeigt am Parameter der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Es treten tubuläre und vaskuläre Gewebsschäden auf, die sich im Verlauf von 2-3 Tagen Reperfusion durch vaskuläre und inflammatorische Prozesse noch verstärken. Erst danach setzen Phasen der Erhaltung und Reparatur ein, sofern der Nierenschaden nicht schon zu stark ausgeprägt war. Abbildung modifiziert entnommen aus [45].

zur Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) etabliert – *in vivo* beispielsweise durch gezielte, reversible Okklusion (Abklemmen) von Blutgefäßen [41]. *Ex vivo* können einzelne entnommene Organe perfundiert und dabei I/R-Ereignisse induziert werden [46]. Auch *in vitro* sind auf Gewebe-Ebene [47] und Zellebene [48] Modelle zur Untersuchung des I/R-Schadens etabliert.

Die genannten Herangehensweisen wurden vielfach genutzt, um die Rolle der CYP-Eicosanoide bei I/R-Organschaden eingehend zu untersuchen, siehe Tabelle 1-1. Die Aktivierung Eicosanoid-freisetzender Mechanismen (vgl. Abbildung 1-2) führt unter anderem über Bradykinin, Angiotensin II, Endothelin-1, Adenosin und Vasopressin zu einer vaskulären und tubulären Antwort der Niere [49, 50]. Bei I/R-Schaden von Rattennieren im Modell der Uninephrektomie (UNX) bewirkt die Inhibition von 20-HETE eine verringerte tubuläre Nekrose und Apoptose, verbesserte Perfusion und Anti-Inflammation in der frühen Reperfusionsphase [41, 51, 52], sowie in anderen Organen eine verringerte Ausprägung ischämisch induzierter Schlaganfälle [53] und Herzschiäden [54]. Ein entgegengesetzter, protektiver Effekt wurde hingegen im bilateralen Nieren-I/R-Modell beschrieben, die Rolle von 20-HETE ist ambivalent (vgl. Abschnitt 4.1.3). Die Wirkung von EETs wurde anhand von Kardiomyozyten und Endothelzellen als antiapoptotisch bei Hypoxie/Reoxygenierung (H/R) aufgezeigt [55-57]. *In vivo* wurde eine verringerte Infarktgröße ischämischer Herzen bei Applikation von 11,12-EET und 14,15-EET beobachtet [58], sowie eine Assoziation von renalem Organschaden mit EET-Mangel festgestellt [59]. Durch eine Überexpression von EET-bildenden CYP-Isoformen konnte der ischämische Nierenschaden verringert werden [23, 60]. Eine Verringerung des Schadens in Bezug auf Nieren und Herzen trat auch durch geeignete sEH-Inhibitoren ein, die den Abbau der EETs zu Diolen hemmen [61] (vgl. Abschnitt 1.3). Ebenso wirkte sich ein sEH-Knockout in einer verringerten Infarktgröße bei ischämischen Herzen aus [62]. Die Wirkung der  $\omega$ -3-PUFA-abgeleiteten CYP-Eicosanoide bei I/R-Schaden steht noch am Anfang der Erforschung – für 19,20-EDP konnte an Herzzellen *in vitro* eine protektive Wirkung bei H/R gezeigt werden [63].

Der zelluläre Wirkmechanismus der CYP-Eicosanoide in der Niere wird in Kapitel 4.1.3 näher beschrieben und diskutiert.

**Tabelle 1-1 Rolle von CYP-Eicosanoiden in Modellsystemen des I/R-Schadens**

Modell	Pharmakologische oder genetische Intervention	Effekt	Ref.
<b>Herz</b>			
H/R von Herzmuskelzellen	19,20-EDP	Verminderung des H/R-Schadens und Verbesserung der Mitochondrienfunktion durch 19,20-EDP	[63]
H/R von Herzmuskelzellen und neonatalen Ratten-kardiomyozyten	8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET	Bei H/R-Schaden: Verringerung von Apoptose und Verbesserung der Schlagfunktion neonataler Ratten-Kardiomyozyten durch EETs	[55]
H/R von Aorten-Endothelzellen	Überexpression von CYP2J2	Verringerte H/R-Schädigung der Zellen mit CYP2J2-Überexpression	[56]
Globale I/R im isolierten Rattenherz	11,12-EET; 14,15-EET; 19-HETE	Verbesserte Herzfunktion nach Ischämie durch 11,12-EET, nicht 14,15-EET und 19-HETE	[64]
Globale I/R im isolierten Mausherz	Globaler sEH-Knockout; EET-Antagonist	Verbesserte Herzfunktion nach Ischämie bei sEH-Knockout-Tieren; Aufhebung durch EET-Antagonist	[62]
Globale I/R im isolierten Mausherz	Überexpression von CYP2J2 in Kardiomyozyten oder Endothel	Verbesserte Wiederherstellung der Herzfunktion bei Mäusen mit kardiomyozyten-, nicht jedoch endothelspezifischer Überexpression von CYP2J2	[65-67]
Koronararterien-Ligation in Ratten und Hunden	11,12-EET; 14,15-EET; EET-Antagonist; sEH-Inhibitor	Verringerte Infarktgröße durch 11,12-EET, 14,15-EET, und sEH-Inhibitor. Aufhebung der Effekte durch EET-Antagonist.	[58, 68]
Koronararterien-Ligation in Ratten und Hunden	Inhibitor der CYP-( $\omega$ )-Hydroxylase	Verringerte Infarktgröße durch CYP-( $\omega$ )-Hydroxylase-Inhibitor sowohl bei Ratten als auch Hunden	[54, 69]
<b>Gehirn</b>			
Okklusion der mittleren zerebralen Arterie	Inhibitor der CYP-( $\omega$ )-Hydroxylase	Verringerung der ischämischen Infarktgröße durch CYP-( $\omega$ )-Hydroxylase-Inhibitor	[53]
Okklusion der mittleren zerebralen Arterie	sEH-Inhibitor in Ratten oder sEH-Knockout in Mäusen, Östrogen	Protektiver Effekt von Östrogen teilweise durch Unterdrückung der zerebralen sEH-Expression vermittelt	[70]
Intrazerebrale Hämorrhagie in Ratten	Inhibitor der 20-HETE-Synthese	Verringerte Infarktgröße durch Inhibition der 20-HETE-Synthese	[53]
<b>Niere</b>			
ATP-Depletion in renalen Epithelzellen	Cyp4a12-Überexpression 20-HETE-Inhibitor	Cyp4a12-Überexpression verstärkt- und 20-HETE-Inhibition verringert Schädigung der Zellen	[71]
H/R in renalen Epithelzellen	14,15-EET, 19,20-EDP	14,15-EET reduziert- und 19,20-EDP verstärkt H/R-bedingte Apoptose	[72]
Okklusion der renalen Arterie und Vene nach UNX über 45 min <i>in vivo</i> bei Ratten	Inhibitor der CYP-( $\omega$ )-Hydroxylase; 20-HETE-Antagonist	Sowohl Hemmung der Bildung als auch -Wirkung von 20-HETE verringert I/R-Schaden der Niere	[41]
Bilaterale Okklusion der renalen Arterie und Vene über 45 min <i>in vivo</i> bei Ratten	20-HETE-Agonist	Verringerter I/R-Schaden der Niere durch 20-HETE-Agonist	[73]

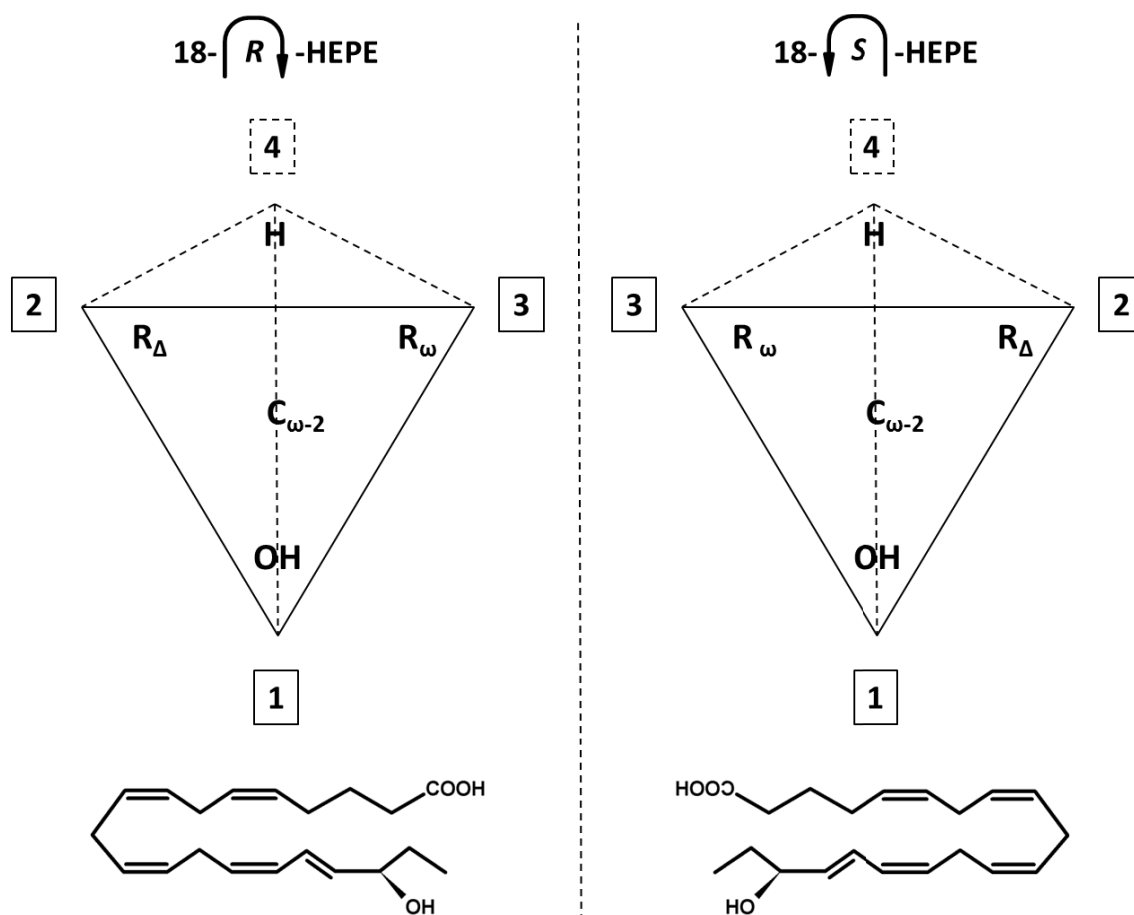
## **1.5 Stereoisomerie von Eicosanoiden**

Neben den bereits beschriebenen Regioisomeren, treten viele Eicosanoide zudem als Stereoisomere auf, wobei deren biologische Wirkung auch bei ischämischem Organschaden – sofern dies untersucht wurde – oftmals auf nur ein bestimmtes Stereoisomer zurückgeht oder zumindest stereospezifisch ist. Bevor Einzelheiten zur stereospezifischen Bedeutung der Eicosanoide genannt werden, folgen einige begriffliche Einordnungen:

Stereoisomere weisen dieselbe Summenformel und Konstitution auf, unterscheiden sich jedoch in der räumlichen Anordnung der Substituenten, ihrer Konfiguration. Eicosanoide sind chiral, wenn als Stereozentrum mindestens ein C-Atom mit vier unterschiedlichen Substituenten vorliegt. Es gibt weitere Eigenschaften, die die Chiralität eines Moleküls bewirken können. Ein Sonderfall sind meso-Formen, die trotz Vorliegen von Stereozentren achiral sind. Typisch für chirale Moleküle ist ihre optische Aktivität, das heißt ihre Fähigkeit, den Drehwinkel polarisierten Lichts zu verändern. Einfach oxidierte Eicosanoide mit einer terminalen Hydroxylgruppe wie 20-HETE besitzen kein Stereozentrum und sind daher achiral. Bei 19-HETE hingegen liegt in  $\omega$ -1-Position ein Stereozentrum vor. Die beiden denkbaren räumlichen Anordnungen der Hydroxylgruppe und des Wasserstoffs am C-Atom werden als *R*- und *S*-Konfiguration angegeben. Diese Angabe hat nicht zwangsläufig etwas mit dem Drehwinkel des polarisierten Lichts zu tun (im Sinne von rechts- oder linksdrehend), sondern beruht auf einer standardisierten Projektion des Moleküls nach der CIP-Konvention [74], wobei alle Substituenten einer Prioritätsregel folgend abgezählt werden und so die Konfiguration bestimmt wird, siehe Abbildung 1-8.

Enantiomere sind eine Untergruppe chiraler Stereoisomere, die sich spiegelbildlich zueinander verhalten. Sie besitzen identische physikalische, aber unterschiedliche chemische und biologische Eigenschaften. Eicosanoide mit mehreren Stereozentren sind nur dann Enantiomere, wenn sie sich in allen Stereozentren unterscheiden, beispielsweise 14(*R*),15(*S*)-EET und 14(*S*),15(*R*)-EET. Andernfalls handelt es sich um Diastereomere, die sich nicht spiegelbildlich zueinander verhalten, beispielsweise 17(*R*),18(*S*)-ResolvinE3 und 17(*R*),18(*R*)-ResolvinE3. Diese sind gleichzeitig auch Epimere, da sie sich in genau einem Stereozentrum in ihrer Konfiguration unterscheiden. Wie bei ResolvinE3 sind oft weitere Diastereomere dieses Moleküls chemisch stabil, die biologisch jedoch nicht vorkommen. Diastereomere unterscheiden sich nicht nur in chemischen, sondern auch in ihren physikalischen Eigenschaften, weshalb deren chromatografische Trennung einfacher möglich ist als bei Enantiomeren, für deren Auflösung spezielle chirale Phasen benötigt werden (vgl. Abschnitt 1.6).

Zu den Diastereomeren zählen auch *cis-trans*-Isomere, die die räumliche Ausrichtung der Kohlenwasserstoffkette beschreiben. Im Falle von C-C-Einfachbindung ist diese Ausrichtung variabel – die sogenannten Konformationsisomere lassen sich ohne Bindungsbrüche frei ineinander überführen, weshalb sie ausgesprochen instabil sind und deren Unterscheidung experimentell kaum möglich ist.



**Abbildung 1-8 Darstellung der Enantiomerie am Beispiel von 18-HEPE**

18-HEPE besitzt in  $\omega$ -2-Position ein Stereozentrum im Molekül, es tritt daher Enantiomerie auf. 18(*R*)-HEPE und 18(*S*)-HEPE verhalten sich spiegelbildlich zueinander. Es handelt sich jedoch nicht um identische Moleküle, da sie durch Drehung räumlich nicht zur Deckung gebracht werden können. Sie können deshalb unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf die Bindung an Enzyme oder Rezeptoren haben. Zur Bestimmung der Konfiguration auf Basis der Cahn-Ingold-Prelog-Konvention (CIP-Konvention) [74], werden zunächst die Prioritäten der Substituenten festgestellt. Jene mit der größten Ordnungszahl (im Zweifelsfall der größten atomaren Masse) erhalten die höchste Priorität 1, darauffolgend mit absteigender Priorität die niedrigeren Ordnungszahlen. Das C-Atom in  $\omega$ -2-Position ist mit zwei weiteren C-Atomen verbunden. Um festzustellen, welches die höhere Priorität hat, werden die Bindungsverhältnisse beider C-Atome jeweils betrachtet und auch dort nach Priorität sortiert. C-C-Doppelbindungen werden dabei als zwei C-Atome gewertet. Deshalb stellt sich der zum Anfang des Moleküls führende Rest  $R_{\Delta}$  als jener mit der höheren Priorität dar. Ist die Priorisierung klar, wird im Stereozentrum die Anordnung der C-Substituenten in Tetraeder-Form so betrachtet, dass sich der Substituent mit der niedrigsten Priorität im Hintergrund befindet. Nun wird festgestellt, ob die vergebenen Prioritäten der drei Substituenten im Vordergrund im Uhrzeigersinn oder gegen den Uhrzeigersinn die Zahlenfolge 1-2-3 ergeben, woraus sich die *R*-beziehungsweise *S*-Konfiguration des betrachteten Stereozentrums ableitet. Anmerkung: Die räumliche Struktur der Eicosanoide und PUFAs wird in den Strukturformeln der vorliegenden Arbeit aus Platzgründen in der gezeigten „Knick“-Darstellung wiedergegeben.

Im Falle von C-C-Doppelbindungen, sowie bei C-C-Einfachbindungen in Ringsystemen, ist freie Drehbarkeit ohne Bruch der Bindung jedoch nicht möglich. Hier liegen statische *trans*- oder *cis*-Konfigurationen vor, die alternativ mit der *E/Z*-Nomenklatur beschrieben werden. Die C-C-Mehrfachbindungen der CYP-Eicosanoide enzymatischen Ursprungs sind meist *cis*-konfiguriert, woraus sich die gekrümmte räumliche Struktur der Moleküle ergibt. Bei COX- und LOX-katalysierten Reaktionen können jedoch auch *trans*-Konfiguration neu in das Molekül eingefügt werden, etwa bei der Bildung von Prostaglandinen und Monohydroxiden. Auch die cyclische Epoxidgruppe der Monoepoxide bewirkt eine starre C-C-Bindung, wobei CYPs dort stets eine *cis*-Konfiguration hervorbringen, sofern das Substrat eine *cis*-konfigurierte PUFA war. Durch chemische Modifikation, werden mit der Nahrung jedoch auch PUFAs mit einer oder mehreren *trans*-konfigurierten Kohlenstoffbindungen aufgenommen, aus denen wiederum *trans*-Isomere der Eicosanoide mit abweichenden Eigenschaften entstehen können (vgl. Abschnitt 4.2).

Bereits die stereospezifische enzymatische Bildung der Eicosanoide zeigt die biologische Bedeutung der Stereoisomerie auf. Während die Selektivität der CYPs sowohl in Bezug auf die Bildung von Monohydroxiden [75] als auch Monoepoxiden [12, 76] sehr individuell ausgeprägt ist, synthetisieren LOX-Enzyme in den meisten Fällen Eicosanoide in *S*-Konfiguration [77]. Die Bildung von Prostaglandinen durch COX unterliegt ebenfalls einer streng stereochemischen Kontrolle, wobei allein im Cyclopentanring drei bis vier Stereozentren vorliegen. Bemerkenswert ist die Veränderung der Produktbildung und Stereoselektivität in Abhängigkeit von einer Acetylierung der COX-2 durch Aspirin – anstatt (15(*S*))-ProstaglandinH<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) kommt es zur Synthese von 15(*R*)-HETE [78], das ebenso wie 15(*S*)-HETE ein Precursor für die Lipoxine ist, die zum antiinflammatorischen Effekt von Aspirin beitragen [79].

Die biologische Wirkung von Stereoisomeren der Eicosanoide ist für viele COX- und LOX-Produkte gut beschrieben, da deren Bildung wie erwähnt bereits bekannt und stark selektiv ist. Demnach kann von der beobachteten biologischen Wirkung etwa der Prostaglandine bereits auf das verantwortliche Stereoisomer geschlossen werden, ohne eine chirale Analyse durchführen zu müssen. Das genannte Beispiel der 15-HETE-Bildung zeigt jedoch bereits Grenzen dieser Herangehensweise auf. Sind CYPs an der Synthese beteiligt, ist diese Vorgehensweise dann grundsätzlich nicht mehr möglich. Auch in ein- und demselben Organismus – ja Organ und Gewebe – treten dann stets mehrere Stereoisomere unbekannter Zusammensetzung auf. Mangels geeigneter analytischer Methoden (vgl. Abschnitt 1.6), konnte die biologische Bedeutung solcher Stereoisomere im Zusammenhang mit ischämischem Organschaden oder anderen pathophysiologischen Zuständen *in vivo* bisher kaum erforscht werden. Aus *in vitro*-Versuchen jedoch, ging stets eine stereospezifische Wirkung der Eicosanoide hervor. So konnte in neonatalen Rattenkardiomyozyten gezeigt werden, dass die (*R,S*)-Enantiomere von 17,18-EEQ und 19,20-EDP einen starken Einfluss auf Ca<sup>2+</sup>-Haushalt und die Schlagfrequenz der Zellen haben, während von den korrespondierenden (*S,R*)-Enantiomeren keine

derartige Wirkung ausging [80]. In humanen Endothelzellen wurden stereospezifisch von 11(*R*),12(*S*)-EET die cAMP-Bildung, Angiogenese und Zellmigration stimuliert [81]. ATP-sensitive K<sup>+</sup>-Kanäle wurden in Rattenherzen durch 11(*S*),12(*R*)-EET aktiviert, während das korrespondierende Enantiomer inaktiv war [82]. In vaskulären Glattmuskelzellen (VSMCs) von Ratten wurden Ca<sup>2+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle spezifisch von 11(*R*),12(*S*)-EET und 17(*R*),18(*S*)-EEQ stimuliert [83]. Dies konnte ähnlich an renalen VSMCs gezeigt werden, wobei auch die resultierende Vasodilatation in präparierten renalen Arterien stereospezifisch beobachtet wurde [84]. Von den chiralen CYP-abhängig gebildeten Monohydroxiden hob 19(*R*)-HETE in Aortenendothelzellen von Rindern die 20-HETE-vermittelte Senkung der NO-Level wieder auf, während 19(*S*)-HETE inaktiv war [85]. Die Sensitivität der Kontraktion interlobärer Nierenarterien in Gegenwart von 20-HETE, konnte durch 19(*R*)-HETE und 18(*R*)-HETE enantiospezifisch verringert werden [86]. Im Modell der isolierten perfundierten Hasenniere bewirkten 16(*R*)- und 18(*R*)-HETE enantiospezifisch eine Verringerung des Perfusionsdrucks, der Effekt war allerdings COX-abhängig [87]. Auch Monoepoxide sind als COX-Substrate bekannt [25]. Nicht geklärt ist demnach auch in Hinblick auf nicht identifizierte Rezeptoren die Frage, ob die enantiospezifische Wirkung unmittelbar, oder erst in Gestalt sekundär gebildeter, unerforschter Diastereomere eintritt.

Auch die Speicherung der Eicosanoide in Membranen erfolgt stereospezifisch [88], ebenso wie deren Inaktivierung durch Epoxid-Hydrolasen [89], auf die im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit ausführlich eingegangen wird.

## **1.6 Chirale Eicosanoid-Analytik**

Die Entdeckung der verschiedenen Eicosanoide zog die Notwendigkeit für analytische Methoden zur Auflösung der Isomere nach sich, um deren spezifische Bildung, Metabolisierung, und biologische Wirkung zu beschreiben. Während sich Regio- und Diastereomere aufgrund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften oft problemlos mittels Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC) oder Gaschromatografie (GC) trennen ließen, gestaltete sich die Auflösung von Enantiomeren schwierig. Spezielle stationäre Phasen mit chiralen Selektoren wurden erforderlich, zudem mussten die Enantiomere zunächst durch Derivatisierung in Diastereomere überführt werden, um ausreichende Trennung und/oder Sensitivität der Messung zu erreichen. Eine chirale Analyse enantiomerer Monohydroxide ohne Derivatisierung wurde erstmals an der HU Berlin im Jahr 1987 beschrieben, wobei es sich um Normalphasen(NP)-HPLC mit UV-Detektion handelte [90]. Die chirale Trennung von Monoepoxiden (EETs) wurde erstmals 1989 in Nashville beschrieben [91], allerdings noch mit derivatisierten Enantiomeren. Als stationäre Phasen kamen polysaccharidbasierte chirale Selektoren (Säulen *Chiralcel-OD* und *-OB*) teilweise bereits unter reverse Phasen (RP)-Bedingungen zur Verwendung. Aufgrund geringer Standfestigkeit der

stationären Phasen unter wässrigen Bedingungen, wurde damals jedoch die Arbeit mit unpolaren Laufmitteln angestrebt. Die damaligen Methoden ermöglichten es bereits, die Enantiomere endogen vorkommender EETs in Leber [92], Niere [93], Lunge [94] und Blutplasma [95] zu analysieren. Hierzu war jedoch die achirale chromatografische Vortrennung der Proben in ein- oder sogar zwei Stufen erforderlich, sowie weitere Umstände, die eine Routine-Anwendung unmöglich machten. Zudem reichte die Sensitivität nicht aus, um auch freie Enantiomere zu bestimmen.

In der Folgezeit ermöglichte Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), siehe Abbildung 1-9 und Tabelle 1-2, eine spezifischere und sensitivere Messung von Eicosanoiden als bisherige UV-Detektoren. So wurde es möglich, gezielte, reproduzierbare und hochsensitive Analysen für hunderte Eicosanoide in biologischen und klinischen Proben durchzuführen [96, 97]. In Bezug auf Stereoisomere, machte die MS/MS-Analytik umständliches Vorreinigen komplexer biologischer Matrix entbehrlich. Das Verfahren der Elektrospray-Ionisierung (ESI) war jedoch mangels ionisierbarer Moleküle nicht kompatibel mit unpolaren Laufmitteln der chiralen Normalphasen-HPLC. Daher wurden drei verschiedene Wege der weiteren Entwicklung chiraler Eicosanoidanalyse eingeschlagen:

- a) Mittels Electron Capture Atmospheric Pressure Chemical Ionization (EC-APCI) ist die Verwendung unpolarer Laufmittel in Kombination mit MS/MS möglich, sofern die Eicosanoide vor Analyse derivatisiert werden [98]. Auf diese Weise konnte beispielsweise die Stimulation von HETE-Enantiomeren in humanen Blutproben analysiert werden [99].
- b) Eine zweite Variante ist die Kombination von Normalphase-Laufmitteln mit ESI-MS/MS, wobei dem Laufmittel vor Beginn der MS/MS-Analyse eine gut ionisierbare Komponente zugesetzt wird [100].
- c) Ein dritter Weg ist der Betrieb der chiralen Säulen mit wässrigem Laufmittel [101, 102], wobei die Kopplung mit einer achiralen Säule die Trennung von Eicosanoiden und Regioisomeren innerhalb eines analytischen Laufs verbesserte [103]. Auf die Weise konnten bereits zahlreiche mehrfach oxidierte- und Monohydroxy-Eicosanoide simultan chiral in biologischen Proben gemessen werden [104].

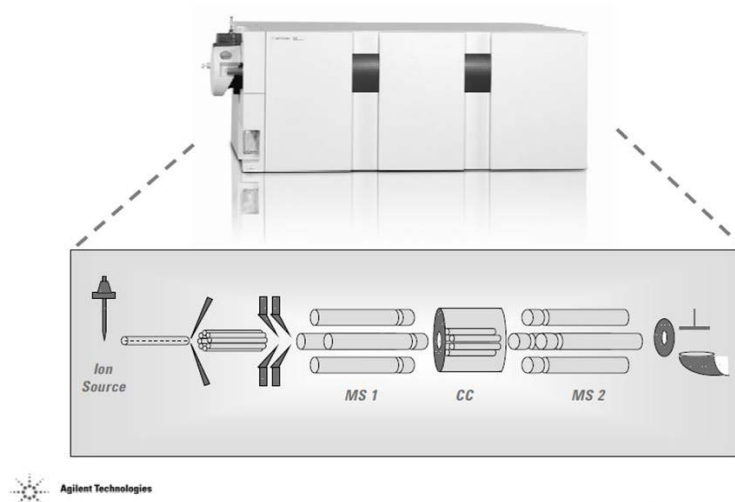
Chirale Methoden zur Bestimmung von Monoepoxy-Eicosanoiden in biologischen Proben wurden bisher nur vereinzelt für EETs beschrieben und sind für Routineanwendung aufgrund erforderlicher Vortrennung auf achiralen Phasen, enormer Retentionszeit von bis über 100 min und zu breiter Peaks ungeeignet [100, 105].



**Tabelle 1-2 Grundbegriffe der Massenspektrometrie**

Tandem-MS (MS/MS)	Siehe Abbildung 1-9
Single-Quad-MS	Nur ein Quadrupol, keine Kollisionszelle. Keine Fragmentierung der Precursor Ionen, diese werden direkt detektiert. Einfacher, weniger fehleranfällig. Selektivität jedoch beschränkt, es kann nur m/z des Moleküls detektiert werden.
Precursor-Ion	Ionisierter Analyt mit charakteristischem Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ).
Produkt-Ion	Produkt-Ionen sind geladene Fragmente eines Precursor-Ions, die in der Kollisionszelle gebildet werden. Ungeladene Fragmente entstehen ebenfalls, werden jedoch nicht detektiert.
Diagnostisches Fragment	Charakteristisches Produkt-Ion, spezifisch für individuelle Analyten mit gleicher Retentionszeit. Wird zur Identifizierung (Qualifier) und Quantifizierung (Quantifier) des Analyten herangezogen. Deren selektive Messung heißt „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM).
m/z	Masse-Ladungsverhältnis eines Analyten ( $m$ = Molekülmasse; $z$ = Ladungszahl).
Intensität	Intensität, Abundanz, Counts. Betrag eines Signals am Detektor. Entspricht nicht der Molekülzahl.
Interner Standard (IS)	Ähnlich dem Analyten, jedoch abweichende Masse (z.B. deuterierter Analyt). Besitzt bekannte Konzentration. Dient als Referenz, um Verluste und Schwankungen der Sensitivität herauszurechnen.

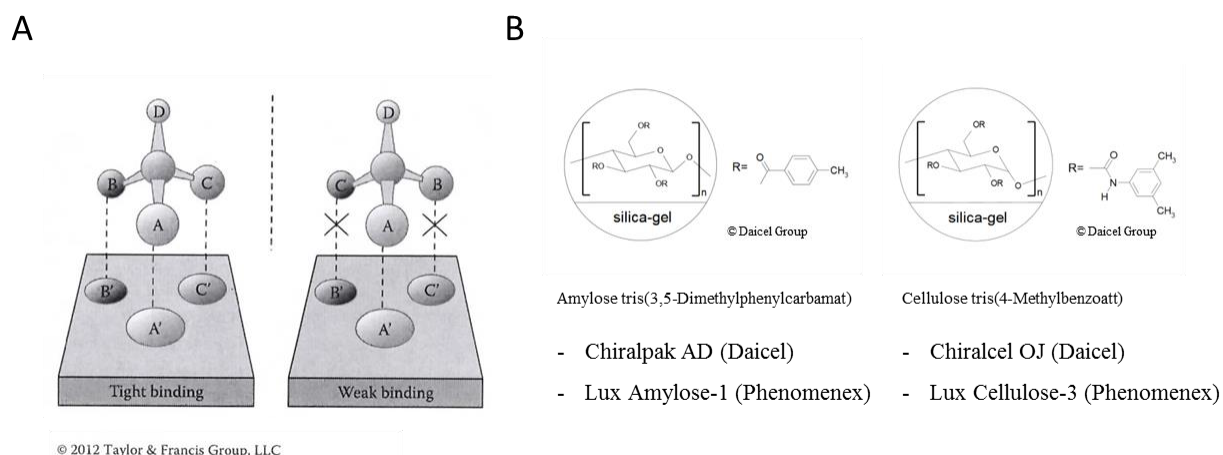
**Agilent QQQ System Diagram**



**Abbildung 1-9 Aufbau der MS/MS, schematisch**

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers (MS/MS) am Beispiel der Agilent QQQ-MS. In einer Nebelkammer wird ein Aerosol der Probe erzeugt. Es folgt die Ionisation der Probe im ESI-Verfahren. Die Ionen gelangen in eine Kapillare, in der Unterdruck anliegt, und werden durch einen Skimmer beschleunigt und von Neutralgas und Lösungsmittelresten befreit. Die Ionen gelangen in einen Oktopol, der zur Fokussierung und Homogenisierung der Energieverteilung dient. Es schließt sich der erste Quadrupol an, der als Massefilter dienen kann (SIM-Modus) oder alle Massen erfasst (SCAN-Modus). Das Filtern bestimmter Massen erfolgt durch variable elektrische Felder, wobei zwei Stäbe des Quadrupols stets negativ, die anderen beiden positiv geladen sind, wobei unerwünschte Massen abgelenkt werden. Dahinter die Kollisionszelle (ein Hexapol), in der die Ionen mit  $N_2(g)$  kollidieren und dabei fragmentieren. Ionisierte Fragmente werden selektiv durch einen zweiten Quadrupol geleitet und von einem High Energy Dynode-Detektor anhand ihres Masse-Ladungsverhältnisses gezählt und das Signal amplifiziert. Die Daten werden im Massespektrum aufgezeichnet und mittels der MassHunter-Software ausgewertet. Abbildung entnommen aus *Agilent Technologies, Student manual*, 2006.

Der Mechanismus chiraler Separation ist noch wenig verstanden. Für die Trennung der Eicosanoid-Enantiomere sind chirale Säulen verbreitet, auf deren Silica-Gel eine nicht kovalent gebundene Schicht Cellulose oder Amylose aufgetragen ist. Die OH-Gruppen der Polysaccharide (PS) sind meist mit einem Carbamat und einer Phenylgruppe derivatisiert (Abbildung 1-10). Dabei treten zwischen den Phenylcarbamat-Gruppen benachbarter Glucose-Einheiten intramolekulare Wasserstoffbrücken (H-Brücken) auf, was die Sekundärstruktur des chiralen Selektors beeinflusst. Grundsätzlich wird an PS-Phasen von einem 3-Punkt-Interaktions-Modell ausgegangen, das zur Stereoselektivität führt [106]. Als chirale Selektoren gelten der Phenyl-Ring ( $\pi$ - $\pi$ -Elektroneninteraktionen), der Effekt elektronegativer Atome wie Chlor (Dipol-Dipol-Überlagerung), freie Elektronen am Carbamat, sowie die helikale Sekundärstruktur der Amylose [107]. Präzise Vorhersagen der Selektivität sind unmöglich, sie muss empirisch ermittelt werden. Weiterhin haben die Zusammensetzung der mobilen Phase, sowie die Temperatur einen Einfluss auf die Stereoselektivität des Systems. Zudem ist aufgrund der relativ polaren PS-Phasen bei hohem Organik-Anteil im wässrigen Laufmittel ein Übergang der Trennbedingungen von RP zu hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) zu beachten [108].



### Abbildung 1-10 Chirale Selektoren und Interaktionsmodell von chiralen Polysaccharid-Phasen

**A)** Theoretisches Modell der 3-Punkt-Interaktion von Polysaccharid-Phasen mit chiralen Analyten, die zu einer stereospezifischen Diskriminierung durch unterschiedlich starke Bindung/Retention an der stationären Phase führt. Abbildung entnommen aus [106]. **B)** Chirale Selektoren jeweils einer Amylose- und Cellulose-basierten Phase. Säulen mit diesen Selektoren werden sowohl von *Daicel* als auch *Phenomenex* mit unterschiedlicher Bezeichnung kommerziell in unterschiedlichen Größen vertrieben und können abhängig vom Lösungsmittel in dem sie ausgeliefert werden, sowohl für NP- als auch RP/Hilic-Chromatografie zum Einsatz kommen. Dies ist grundsätzlich möglich, weil die stationäre Phase weder stark polar noch stark unpolar ist.

## 1.7. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch Anwendung und Entwicklung analytischer Verfahren zum besseren Verständnis der Rolle von CYP-Eicosanoiden bei der Entstehung von ischämischen Endorganschäden beizutragen. Im Einzelnen sollten dazu folgende Fragestellungen untersucht werden:

**1. Bildung von CYP-Eicosanoiden in der Initiationsphase des akuten Nierenversagens.** Bei diesen Untersuchungen sollte insbesondere die Ischämie-induzierte Freisetzung von 20-HETE und EETs untersucht werden, da diese beiden Klassen von CYP-Eicosanoiden die Regulation des Gefäßtonus sowie die Auslösung pro-inflammatorischer und pro-apoptotischer Signalwege in gegensätzlicher Weise beeinflussen (vgl. 1.4). Die entsprechenden Experimente wurden an einem Rattenmodell des I/R-induzierten akuten Nierenversagens in enger Kooperation mit der Charité-Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dragun durchgeführt (DFG-Forschergruppe 1068, Teilprojekt Dragun/Schunck). In diesem Modell sollte zugleich erstmals das therapeutische Potential eines metabolisch stabilen EET-Analoges getestet werden.

**2. Analyse des CYP-Eicosanoid-Profiles bei post-operativem akuten Nierenversagen.** Für diesen Teil der Arbeit standen Plasmaproben aus einer klinischen Studie zur Verfügung, in der das Auftreten von akutem Nierenversagen nach Herzoperationen untersucht wurde. Durch Vergleich der CYP-Eicosanoid-Profile von Patienten, die post-operativ akutes Nierenversagen entwickelten bzw. frei von dieser Komplikation blieben, sollte die Hypothese getestet werden, dass eine erhöhte 20-HETE Bildung ein Risikofaktor für postoperatives Nierenversagen darstellt.

**3. Sekundär-Metabolismus von CYP-Eicosanoiden beim akuten Nierenversagen.** In diesem Teil der Arbeiten sollte die sEH-vermittelte Hydrolyse von EETs (vgl. 1.3) sowie die Bildung von 20-HEETs und 20-THETs (vgl. 1.2) unter *in vivo* Bedingungen untersucht werden. Mit Hilfe von sEH-KO Mäusen sollte zugleich die Hypothese getestet werden, dass eine Stabilisierung der endogenen EET-Spiegel zu einer Verminderung des I/R-induzierten Nierenschadens führt (Kooperation mit Ye Zhu im Rahmen der DFG-Forschergruppe 1068).

**4. Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur „Chiralen Lipidomik“ von Eicosanoiden.** Ausgehend von der stereospezifischen Bildung und Wirkung von Oxylipinen (vgl. 1.5), bestand eine wesentliche Aufgabe im Aufbau eines neuartigen analytischen Verfahrens zur Messung von enantiomeren Monoepoxy- und Monohydroxy-Metaboliten langkettiger PUFAs in biologischen und klinischen Proben. Dazu sollte ein System etabliert werden, das eine Trennung der regio- und stereoisomeren Metaboliten durch chirale Reverse Phasen-LC und ihren anschließenden hochsensitiven Nachweis mittels Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) ermöglicht. Diese Arbeiten wurden im Rahmen eines durch das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) geförderten Kooperationsprojekts der AG Schunck (MDC; KF 2135009) und der Lipidomix GmbH, Berlin (Dr. Michael Rothe; KF 2660402) durchgeführt.

## **2. Material und Methoden**

## **2.1 Präparative Methoden**

### **2.1.1 Präparation von Cyp4a12a-Mikrosomen aus Sf9-Insektenzellen**

#### **Benötigen Materialien**

Braunsonic 300 S Ultraschallgerät (B.Braun Melsungen®); Sorvall Combi Plus Ultrazentrifuge (Du Pont®)

Kleine Glaspotter

1fach PBS – Puffer: 135 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Mikrosomenpuffer: 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, pH 7,4

Aufschlusspuffer: Mikrosomenpuffer + 0,5 mM DTT, 1 µM FAD+FMN, 100 µM PMSF (frisch ansetzen)

PMSF: 100 mM in Isopropanol; DTT: 1 M in H<sub>2</sub>O; FAD+FMN: 1 mM in H<sub>2</sub>O

#### **Versuchsdurchführung**

Mikrosomen wurden aus Sf9-Insektenzellkulturen präpariert, um rekombinante Expressionen von Cyp4a12a zu gewinnen. Das Enzym wurde zur Synthese von HEETs [23] benötigt. Die Klonierung des benötigten Vektors ist in der Diplomarbeit des Autors beschrieben [24].

- Zellen in 50 ml – Falcons aufteilen
    - Zentrifugation: 10 min, 500 g, 4°C
  - Pellet zu 0,5 Volumenanteilen in PBS vorsichtig mit Glaspipette waschen
    - Zentrifugation: 10 min, 500 g, 4°C
  - Pellet mit N<sub>2</sub> (l) schockfrieren und auf Eis auftauen lassen (Zellaufschluss)
  - Pellet in Aufschlusspuffer resuspendieren (8 ml pro 100 ml Kultur)
  - Ultraschall: 20 s, 300 W, 25% Amplitude, 2 Impulse, dazwischen 20 s Pause (zweiter Zellaufschluss)
    - Zentrifugation: 5 min, 3000 g, 4°C (Abscheidung grober Zelltrümmer)
  - Überstand in Zentrifugenröhrchen füllen
    - Zentrifugation: 10 min, 10 000 g, 4°C (Abscheidung mitochondrialer und schwerer Membranfraktionen)
  - Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen füllen
    - Zentrifugation: 65 min, 100 000 g, 4°C (Pelletierung der Mikrosomen)
- Pellet in kleinen Glaspotter überführen und in Mikrosomenpuffer (300 µl pro 100 ml Kultur) homogenisieren. Blasenbildung vermeiden. Teilpellets zusammenführen und gut mischen
- Homogenisierte Mikrosomen aliquotieren, in N<sub>2</sub> (l) schockfrieren und bei -80°C lagern

### **2.1.2 Präparation von Mikrosomen aus muriner Leber und Niere**

#### **Benötigen Materialien**

Motorgetriebener Teflon/Glaspotter (Elvehjem); Sorvall Combi Plus Ultrazentrifuge (Du Pont®); Glaspotter 10 ml und 2 ml.

Mikrosomenpuffer (pH = 7,7): 50 mM Tris-HCl, 20 % Glycerin, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,7

Aufschlusspuffer P<sub>A</sub> (pH = 7,4): 50 mM Tris-HCl, 0,25 M Saccharose, 2 mM EDTA, 0,15 M KCl, 2 mM DTT, 0,25 mM PMSF (frisch ansetzen)

DTT: 1 M in H<sub>2</sub>O; PMSF: 100 mM in Isopropanol

### **Versuchsdurchführung**

Gewebsmikrosomen wurden präpariert, um sie entweder für Untersuchungen der CYP-Aktivität (vgl. Abschnitt 2.2.1.4) oder der Substratspezifität muriner und humaner mEH (Abschnitt 2.2.2) zu verwenden.

- Zwei Mausnieren oder 0,5 g Leber in großen Glaspotter platzieren und mit 4 ml P<sub>A</sub> auf Eis 20s homogenisieren. Pausen zum Abkühlen lassen, Luftblasen vermeiden.
- Homogenat in Zentrifugenröhrchen überführen. Potter mit 5 ml P<sub>A</sub> spülen.
  - Zentrifugation: 10 min, 1000 g, 4°C (Abscheidung von Zelltrümmern)
- Überstand in neues Zentrifugenröhrchen füllen
  - Zentrifugation: 10 min, 20 000 g, 4°C (Abscheidung mitochondrialer und schwerer Membranfraktionen)
- Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen füllen
  - Zentrifugation: 90 min, 100 000 g, 4°C (Pelletierung der Mikrosomen)
- Pellet in kleinen Glaspotter überführen und in 200 µl Mikrosomenpuffer homogenisieren. Luftblasen vermeiden.
- Homogenisierte Mikrosomen aliquotieren, in N<sub>2</sub>(l) schockfrieren und bei -80°C lagern

## **2.1.3 Präparation cytosolischer, sEH-enthaltender Fraktionen aus Gewebe**

### **Benötigten Materialien**

Motorgetriebener Teflon/Glaspotter (Elvehjem); Glaspotter 10 ml, Tischzentrifuge Typ 1204, r=6,5 cm (Hettich Tuttlingen)

Aufschlusspuffer (P<sub>A</sub>): 50 mM Tris/HCl, 0,25 M Saccharose, 2 mM EDTA, 0,15 M KCl (ohne DTT, ohne PMSF), pH = 7,4

### **Versuchsdurchführung**

Überstände, die sEH enthalten, wurden aus Mausleber präpariert, um Untersuchungen der Stereospezifität des Enzyms anzustellen (Abschnitt 2.2.2).

- Einwaage von 150 mg Lebergewebe in Glaspotter
- 2 ml P<sub>A</sub> zugeben
- 10 Strokes am motorgetriebener Pistille
- In 2 ml-Reagiergefäß überführen
- Zentrifuge: gekühlte Tischzentrifuge: 10 min 1000 g
- Überstand abnehmen, Pellet verwerfen
- Zentrifuge: gekühlte Tischzentrifuge: 20 min 12 000 g
- 10 µl für Proteinbestimmung abnehmen
- Restlichen Überstand abnehmen und aliquotieren

## **2.1.4 Präparation von Eicosanoiden aus biologischen Proben**

Zum Zweck der chromatografischen und massenspektrometrischen Analyse von Eicosanoiden in biologischen und klinischen Proben, wurden diese mittels Festphasenextraktion präpariert. Infolge der fakultativ angewendeten alkalischen Lyse wurden dadurch auch in Membranen eingebaute Stoffe zugänglich. Die Extrakte wurden mittels LC-MS/MS gemessen [80]. Im Falle von *in vitro* - Versuchen war ein Ausschütteln mittels Ethylacetat ausreichend (vgl. Abschn. 2.2.1.4).

### **2.1.4.1 Gewinnung von Organhomogenaten**

#### **Benötigen Materialien**

Pulverisierwerkzeug von Biospec Products inc®

#### **Versuchsdurchführung**

Zuerst wurden die bei -80°C gekühlten Organstücke durch mechanische Kräfte homogenisiert

- Stempel und Pfanne, sowie ein 1,5 ml-Reagiergefäß in N<sub>2</sub> (*l*) vorkühlen
- Ein kleines Stück Gewebe kurz in N<sub>2</sub> (*l*) halten und zügig in der Pfanne platzieren
- Stempel aufsetzen und mit Gummihammer 2-3 mal kräftig draufschlagen
- Pulver mit Spatel schnell in vorgekühltes 1,5 ml-Reagiergefäß füllen

### **2.1.4.2 Präparation mittels alkalischer Hydrolyse**

#### **Benötigen Materialien und Lösungen**

**Interne Standards:** 20-HETE-d6, 15(S)-HETE-d8, 14,15-DHET-d11, 8,9-EET-d11 (Cayman Chemicals); je 0,5 µg/ml

#### **Phosphat-Puffer (Basis : Sörensen) :**

- Lösung A: 11,876g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 1 Liter ( inkl. 5% Methanol (MeOH))

- Lösung B: 9,078g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1 Liter ( inkl. 5% MeOH )

12,1 ml Lösung A + 87,9 ml Lösung B → pH 6

#### **Weitere Lösungen und Lösungsmittel:**

10 mg/ml BHT in Ethanol, 10 M NaOH, 58%ig Essigsäure, Acetonitril (ACN),. H<sub>2</sub>O

#### **Versuchsdurchführung**

- Reagenzglas eintarieren und prüfen, ob es in die Zentrifuge passt
- Etwa 30 mg Organpulver (1,5 ml-Reagiergefäß auf Trockeneis) in das Reagenzglas füllen  
Oder max. 500 µl Plasma einfüllen
- Auf 500 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen
- 5 µl BHT zugeben
- 1,5 ml ACN zugeben
- 300 µl NaOH (SL: 10 M), zugeben
- 10 µl interner Standard zugeben, vorher vortexen

- Inkubation: 2x 15 min im Ofen bei 60°C, zwischendurch vortexen
- 300 µl 58%ige Essigsäure zugeben
- 3,5 ml Phosphatpuffer zugeben
- pH auf 6,0 einstellen
  - Zentrifuge: 10 min, 1500 g
- Ggf. 200 µl für Proteinbestimmung abnehmen

### 2.1.4.3 Präparation ohne Hydrolyse

#### Benötigen Materialien und Lösungen

##### Interner Standard:

20-HETE-d6, 15(S)-HETE-d8, 14,15-DHET-d11, 8,9-EET-d11 (Cayman Chemicals); je 0,5 µg/ml

##### Phosphat-Puffer (Basis : Sörensen) :

- Lösung A: 11,876g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 1 Liter ( inkl. 5% Methanol (MeOH))

- Lösung B: 9,078g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1 Liter ( inkl. 5% MeOH )

12,1 ml Lösung A + 87,9 ml Lösung B → pH 6

##### Weitere Lösungen und Lösungsmittel:

10 mg/ml BHT in Ethanol, 20%ig Glycerin in H<sub>2</sub>O, 58%ig Essigsäure, Acetonitril (ACN), H<sub>2</sub>O

N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidiny]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-urea (TPPU) (Cayman Chemicals), 4 mM in DMSO

#### Versuchsdurchführung

- Reagenzglas eintarieren und prüfen, ob es in die Zentrifuge passt
- Etwa 30 mg Organpulver (1,5 ml-Reagiergefäß auf Trockeneis) in das Reagenzglas füllen  
Oder max. 500 µl Plasma einfüllen
- Auf 500 µl mit H<sub>2</sub>O (versetzt mit 4 µM TPPU) auffüllen
- 100 µl 20%iges Glycerin zugeben
- 5 µl BHT zugeben
- 0,5 ml ACN zugeben
- 10 µl interner Standard zugeben, vorher vortexen; vortexen
- 2,0 ml Phosphatpuffer zugeben
- pH auf 6,0 einstellen
  - Zentrifuge: 10 min, 1500 g
- Ggf. 200 µl für Proteinbestimmung abnehmen

### 2.1.4.4 Festphasenextraktion an Bond-Elut-Certify-II-Säule

#### Benötigen Materialien

Bond-Elut-Certify-II-Säulen (Agilent), Vakuumpumpe, Glaskasten mit Einsätzen, Heizblock mit Begasungsmöglichkeit

##### Phosphat-Puffer (vgl. Abs. 2.2.5.2)

**Waschpuffer:** 50% Methanol in H<sub>2</sub>O



**Elutionspuffer:** 75 ml Hexan; 25 ml Essigsäureethylester; 1 ml Essigsäure (Eisessig)

Glycerin 10%ig in Methanol, Acetonitril 60% in H<sub>2</sub>O, Methanol/Acetonitril/ H<sub>2</sub>O 25:25:50, Methanol

### **Versuchsdurchführung**

- Bond-Elut-Certify-II-Säule (200 mg)
- 3 ml Methanol zur Spülung
- 6 ml Phosphat-Puffer
- Überstand aus Abs. 2.1.4.2 oder 2.1.4.3
- + 3 ml Waschpuffer
- Trockensaugen lassen: 3 min (Vakuum an Schlauchschelle erhöhen), danach ausklopfen
- 20 µl 10%iges Glycerin in Auffang-vial vorlegen
- 2x je 1 ml Elutionspuffer, jeweils mit N<sub>2</sub> (g) im Heizblock bei 40°C einengen
- Rückstand in 100 µl ACN (60%ig) aufnehmen, Vortexen (bei freien Metaboliten: Resuspendierung in Methanol/Acetonitril/ H<sub>2</sub>O 25:25:50)
- In vial mit Insert füllen und mittels Zange verschließen
- Bei Plasma-Proben: vorher noch einmal abzentrifugieren (5 min, 10500 g) und Überstand abnehmen

## **2.2 Biochemische Methoden**

### **2.2.1 Charakterisierung von Mikrosomen**

#### **2.2.1.1 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts**

##### **Benötigen Materialien**

Uvicon 941 plus Spektralphotometer (Kontron®)

Messpuffer: 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Puffer, 20 % Glycerin, 0,3% Emulgen 911, 0,1% Natriumcholat, pH 7,4

Natriumdithionit; CO-Gasflasche, unter Abzug

##### **Versuchsdurchführung**

- Mikrosomen in Messpuffer auf ca. 1 mg/ml verdünnen, Gesamtvolumen 800 µl
- Zugabe kleiner Spatelspitze Natriumdithionit (Reduktionsmittel)
- Messung des Spektrums von 500 – 400 nm (Basislinie)
- Ansatz 1 min mit CO unter dem Abzug begasen (leichte Blasenbildung)
- Messung des Spektrums und Ermittlung des Differenzspektrums (automatisch am PC)
- Absorptionsverlauf 500 – 470 nm als gedachte Basislinie verlängern und daraus Absorption bei 450 und 420 nm ermitteln
- Berechnung der CYP – Konzentration anhand des Lambert – Beerschen Gesetzes:

$$c = E / \varepsilon * d$$

$$\varepsilon = 91/\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

Verdünnungs- oder Aufkonzentrierungsfaktoren sind entsprechend zu berücksichtigen

### 2.2.1.2 Bestimmung der NADPH-CPR-Aktivität

#### Benötigen Materialien

Uvicon 941 plus Spektralphotometer (Kontron®)

Reduktase-Messpuffer: 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

Cyt. c: 0,3 mM in Messpuffer, KCN: 50 mM in Messpuffer, NADPH: 1,5 mM in Messpuffer

#### Versuchsdurchführung

Zur Aktivitätsbestimmung diente Cytochrom c, das im reduzierten Zustand ein Absorptionsmaximum bei 550 nm aufweist. Die Cytochrome c Oxidase wurde durch Zugabe von KCN inaktiviert. Die Aktivität der CPR entsprach also der Konzentration von reduziertem Cytochrom c.

- 1 ml Messpuffer
- 250 µl Cytochrom c
- 100 µl KCN
- 50 µl einer 1:50-Verdünnung der Mikrosomen in Messpuffer (1:5 bei Zellen)
- 100 µl NADPH
- Messung in Modus „Zeit-Kurve“ über 1 min
- Berechnung der Reduktase-Konzentration anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes:  
Aktivität (U) =  $\Delta E / \varepsilon * d$ ;  $\varepsilon = 21/\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $d = 1 \text{ cm}$ ; Faktor 1,5 für das Ansatzvolumen;  
Faktor x für Vorverdünnung  
Aktivität (U) =  $\Delta E * 1,5 * \text{Vorverdünnung} / 21$   
Aktivität gereinigter CPR: 60 U/mg, MW = 79 000 Dalton, --> 1 nmol = 4,7 U

### 2.2.1.3 Proteinbestimmung nach Lowry

#### Benötigen Materialien

Uvicon 941 plus Spektralphotometer (Kontron®)

Lösung 1 (frisch angesetzt): 98 ml 0,1 N NaOH mit 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 ml 2 % K-Na-Tartrat, 1 ml 0,5 % CuSO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O

Lösung 2: (frisch angesetzt): 50 %iges Folin-Ciocalteu Reagenz (in a. dest. verd.)

Standard: Rinderserumalbumin 2 mg/ml

Leerwert: 0,1 N NaOH

#### Versuchsdurchführung

Messgröße ist die Absorption bei 750 nm. Infolge einer Reaktionskette verschiedener Metalle kommt es in Gegenwart von Proteinen zum Farbumschlag des Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdänblau, sodass sich die Absorption bei 750 nm vergrößert [109]. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

- Mikrosomen 1:200 in 0,1 M NaOH verdünnen
- 200 µl davon, eines Leerwertes und 10 µl Standard in je 1 ml Lösung 1 überführen, vortexen
  - Inkubation: 10 min, RT
- 100 µl Lösung 1 zugeben, vortexen
  - Inkubation: 30 min, RT
- Messung bei 750 nm
- Anhand einer Eichkurve der Absorption des Standards Proteinwerte berechnen

### 2.2.1.4 Bestimmung der CYP-Enzymaktivität

#### Benötigen Materialien

Vakuumblock, Vortexer, Tischzentrifuge Typ 1204, r=6,5 cm (Hettich Tuttlingen)

HPLC-Anlage (Shimadzu) mit Radioflow-Detektor (Berthold) oder LC-MS (Shimadzu; siehe Abschnitt 2.4)

Substrat: AA, EPA (Cayman Chemicals); [1-<sup>14</sup>C]-AA oder [1-<sup>14</sup>C]-EPA (Hartmann Analytics)

Enzym: Cyp4a12a-CPR-Koexpression [24] und humanes Cytochrom b<sub>5</sub> (Calbiochem/Merck) oder CYP1A1-CPR-Koexpression aus Sf9-Insektenzellen; oder Nieren/Lebermikrosomen (vgl. Abschnitt 2.1.2)

Umsetzungspuffer: 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2

10 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O, 10 mM NADPH in Umsetzungspuffer, 0,4 M Zitronensäure in H<sub>2</sub>O, Ethylacetat, Acetonitril, H<sub>2</sub>O, Ethanol 99,9%ig

#### Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden Mikrosomen rekombinanter CYP-Expressionen oder Gewebemikrosomen mit einem definierten Substrat in Umsetzungspuffer inkubiert. Inkubationen mit rekombinanten LOX-Enzymen wurden abweichend davon in Kooperation mit der AG Kühn der Charité Berlin durchgeführt [110]. Im Folgenden das Versuchsprotokoll für eine nicht-präparative, analytische Inkubation mit 100 µl Ansatzvolumen:

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in fünfmolarem Überschuss zum Substrat in 1,5 ml-Reagiergefäß vorlegen
- 100 µl Ethanol zugeben
- 1 nmol Substrat (AA, EPA, [1-<sup>14</sup>C]-AA oder [1-<sup>14</sup>C]-EPA) zugeben
- Unter N(g)-Strom im Vakuumblock einengen
- Parallel dazu: 10 pmol Cyp4a12a-Mikrosomen mit äquimolar Cytochrom b<sub>5</sub> auf Eis 10 min inkubieren  
Alternativ 10 pmol CYP1A1 oder 80 µg Gewebemikrosomen auftauen lassen
- Enzymatische Fraktion mit Umsetzungspuffer auf 90 µl auffüllen und auf das Substrat geben
- 10 min Präinkubation, 37°C, 400 rpm
- Start der Reaktion mit 10 µl NADPH

- 37°C, 400 rpm, 10 min Inkubation
- Abstoppen der Reaktion mit 5 µl Zitronensäure und Proben auf Eis stellen
- Zugabe von 250 µl Ethylacetat, 30 s vortexen, 1 min 14 000 rpm Zentrifugation
- Obere Phase (Ethylacetat) abnehmen; Extraktion mit der unteren Phase wiederholen
- Extrakt unter N(g)-Strom im Vakuumblock einengen
- Resuspendierung in 50 µl Acetonitril oder 100 µl Acetonitril:Wasser 6:4 (für MS)
- Analyse der Proben mittels HPLC und Radioflow-Detektion oder MS

## 2.2.2 Bestimmung der Stereoselektivität von Epoxid-Hydrolasen

### Benötigen Materialien

Vakuumblock, Vortexer, Tischzentrifuge Typ 1204, r=6,5 cm (Hettich Tuttlingen)

LC-MS/MS (Agilent; siehe Abschnitt 3.2.2)

Umsetzungspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 0,1 mg/ml fettsäurefreies BSA (Sigma)

TPPU (N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidinyl]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-urea), Cayman Chemicals

10 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O, 0,4 M Zitronensäure in H<sub>2</sub>O, Ethylacetat

Substrat: 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EEQ, 19,20-EDP (Cayman Chemicals), sowie aus Racemat präpariertes 11(R),12(S)-EET und 11(S),12(R)-EET (siehe Abschnitt 2.4.4)

Enzym: humane rekombinante sEH (Cayman Chemicals, Item 10011669), murine sEH (vgl. Abschnitt 2.1.3), humane mEH (Thermo Fisher Scientific), murine mEH aus sEH-Knockout-Mauslebern (vgl. Abschnitt 2.1.2)

### Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität von Epoxid-Hydrolasen, wurden unterschiedliche Epoxid-Hydrolasen mit einem oder mehreren racemischen Monoepoxiden in Tris-Puffer inkubiert. Nach einer bestimmten Reaktionszeit schloss sich die Extraktion in Ethylacetat und die Analyse der Metaboliten mittels chiraler ESI-LC-MS/MS an. Die Stereospezifität wurde durch Quantifizierung der noch vorhandenen Substratmenge in Abhängigkeit von der Zeit beschrieben.

- 100 µl Ethanol vorlegen
- Substrat: 10 µM eines oder mehrerer Monoepoxide
- Zugabe von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, fünffach molarer Überschuss zum Substrat
- Einengen im Vakuumblock
- Resuspension in 300- $\mu$ l Umsetzungspuffer
- 400 rpm, 30°C (sEH) oder 37°C (mEH)
- Entnahme von 50 µl als t<sub>0</sub> Wert
- Zugabe von 2 µM TPPU (nur bei Verwendung von humanen Mikrosomen)<sup>2</sup>
- Reaktionsstart durch Zugabe der Hydrolase-Präparation<sup>3</sup> in geeigneter Menge<sup>4</sup>
- Entnahme von jeweils 50 µl nach 5, 10, 20, 40 und 90 min.
- Zugabe von jeweils 2,5 µl Zitronensäure, sofort mit Extraktion (siehe 2.2.1.4) beginnen
- Extraktion und Resuspendierung der Proben entsprechend Abschnitt 2.2.1.4

<sup>1</sup> 300 µl abzüglich der eingesetzten Volumina Hydrolase-Präparat und ggf. TPPU

<sup>2</sup> Bei murinen Mikrosomen war eine Kontamination durch sEH aufgrund Verwendung von sEH-KO-Tieren ausgeschlossen

<sup>3</sup> bei Verwendung von humaner, rekombinanter sEH: Vorverdünnung in Umsetzungspuffer mit 10facher BSA-Konzentration erforderlich.

<sup>4</sup> Durch Testversuche ist zunächst eine geeignete Enzymmenge zu bestimmen, um den stereoselektiven Abbau des jeweiligen Substrats innerhalb von 90 min abbilden zu können

## **2.2.3 Stimulation von Vollblutproben mittels Calcium-Ionophor**

Vollblutproben wurden im Rahmen einer vorausgegangenen Studie [111] gesunden humanen Probanden entnommen und unmittelbar nach Entnahme mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A23187 stimuliert. Das Ionophor wurde in einer Konzentration von 50 µM im Vollblut bei 37°C über 30 min inkubiert. Vehikelkontrolle war 1%ig DMSO. Anschließend wurde das Plasma dieser Proben mittels Zentrifugation gewonnen. Die Plasmen wurden bei -80°C gelagert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Festphasenextraktion entsprechend Abschnitt 2.1.4 und LC-MS/MS-Analytik zugeführt.

## **2.2.4 Synthese von [1-<sup>14</sup>C]-Metaboliten der [1-<sup>14</sup>C]-Arachidonsäure**

Für die Gewinnung von Standards der nicht kommerziell erhältlichen HEETs und THETs, erfolgte die chemische Synthese von [1-<sup>14</sup>C]-EETs aus AA mittels chemischer Epoxidation, sowie deren Präparation in mehreren chromatografischen Schritten. Nicht markierte EET-Standards wurden daraufhin mit den radioaktiv markierten Standards im Verhältnis 20:1 verschnitten. Diese dienten zur enzymatisch katalysierten Synthese von HEETs mittels Cyp4a12a, das bevorzugt terminal hydroxyliert. 20-HEET wurde von 19-HEET chromatografisch abgetrennt (vgl. Abschnitt 2.4.4), ein Teil des 20-HEETs wurde abschließend zu THETs chemisch hydrolysiert.

### **2.2.4.1 Synthese durch chemische Epoxidation**

#### **Benötigen Materialien**

HPLC-Anlage (Shimadzu), Radioflow-Detektor (Berthold), Sintilationsmessgerät (Beckman), Rotationsverdampfer (Büchi)

Oxidationsmittel: 3-Chlorperbenzoesäure (CPB): Pulver, 70%ig (Fluka)

Substrat: [1-<sup>14</sup>C]-AA (Hartmann Analytics)

Dichlormethan, Dimethylsulfid, Ethanol: 99,9%ig

#### **Versuchsdurchführung**

Als Oxidationsmittel wurde 3-Chlorperbenzoesäure (CPB) verwendet.

- SL von CPB ansetzen: 1,51 mg/50 µl (in Dichlormethan), entspricht 15fach molarem Überschuss zu Substrat
- Substrat (436 nmol) am RV einengen

- Resuspension in 1950 µl Dichlormethan
- Zugabe von 50 µl CPB-SL
  - Inkubation: 60 min, RT, dunkel
- Abstoppen der Reaktion durch 2 µl Dimethylsulfid (unter Abzug, starke Geruchentwicklung)
  - Postinkubation: 20 min, RT, dunkel
- Einengen im RV, niedrigen Siedepunkt von Dichlormethan (39,8°C) beachten
- Aufnahme in 110 µl Ethanol
- RP-HPLC in fünf Läufen (10 µl Vorlauf, 2x 50 µl Hauptlauf, 2x 50 µl Spülung), dabei Produkte und verbliebenes Substrat auffangen
- Aufgefangene Produkte im RV einengen und LM der entsprechenden NP-HPLC-Methode (vgl. Abschnitt 2.4.3) aufnehmen
- NP-HPLC-Lauf, Regioisomere auffangen
- Einengen in RV, Resuspension in 100-200 µl Ethanol
- Quantifizierung anhand der Radioaktivität mittels Sintilations-Messgerät

## 2.2.4.2 Enzymatisch katalysierte Synthese von 20-OH-EETs

### Benötigen Materialien

Vortexer, Multifuge Heraeus 1S-R (Thermo Scientific), Rotationsverdampfer (Büchi)

HPLC-Anlage (Shimadzu) mit Radioflow-Detektor (Berthold), Sintilationsmessgerät LS 6000SC (Beckman)

Umsetzungspuffer: 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2

10 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM NADPH in Umsetzungspuffer, 0,4 M Zitronensäure in  $\text{H}_2\text{O}$ , Ethylacetat, Ethanol (99,9 %ig)

Substrat: [1- $^{14}\text{C}$ ]-EETs aus Abschnitt 2.2.4.1, sowie 8,9-EET, 11,12-EET und 14,15-EET von Cayman Chemicals

Enzym: Cyp4a12a-CPR-Koexpressions-Mikrosomen [24] und humanes Cytochrom  $\text{b}_5$  (Calbiochem/Merck)

NADPH-regenerierendes System: Glukose-6-Phosphat,  $\text{MgCl}_2$ , Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

### Versuchsdurchführung

Cyp4a12a-Mikrosomen wurden zur Katalyse von Hydroxylierungsreaktionen an EETs eingesetzt, um größere Mengen an 20-HEETs zu gewinnen [23]. Tabelle 2.1 fasst das methodische Vorgehen zusammen. Die Mikrosomen wurden mittels heterologer Expression in Insektenzellen selbst hergestellt [24].

**Tabelle 2-1 Enzymatische Synthese von HEETs mit Cyp4a12a - Mikrosomen im 4 ml - Ansatz**

	Konzentration (SL)	Konzentration (Ansatz)	Volumen (µl)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 mM	0,4 mM	160
<sup>14</sup> C-EET	0,91 mM	4 µM	17,6
<sup>12</sup> C-EET	0,31 mM	76 µM	980,6
Ethanol			500
	Einengen am Rotationsverdampfer		
CYP4a12a <sup>b)</sup>	4,65 µM	0,1 µM	86,0
Cytochrom b <sub>5</sub> <sup>c)</sup>	62,14 µM	0,1 µM	6,4
	Präinkubation auf Eis, 10 min		
Umsetzungspuffer	100 mM		3066,3
	auf Substrat geben und Mikrosomen dazu, 10 min Präinkubation, 37°C		
G-6-P	31 mM	3,3 mM	425,8
MgCl <sub>2</sub>	1 M	3,3 mM	13,2
G-6-P-DHG	705 U/ml	0,4 U/ml	2,3
NADPH	10 mM	1 mM	400
	Reaktion 20/30/60 min <sup>a)</sup> , 37°C		
	auf Eis stellen		
	Ethylacetat: 16 ml		
	2 min Vortex, 2 min 2000 rpm, wiederholen		
	Einengen am Rotationsverdampfer		
	Aufnahme in 60 µl Ethanol		
	NP-HPLC (vgl. Abschnitt 2.4.3): 10µl Vorlauf, 50 µl Hauptlauf, 50 µl Spülung		
	20-OH-EET auffangen, im Rotationsverdampfer einengen und Quantifizieren		

<sup>a)</sup> Reaktionszeit entsprechend der Substratspezifität von Cyp4a12a: 11,12-EET: 20 min, 8,9-EET: 30 min, 14,15-EET: 60 min

### 2.2.4.3 Chemische Bildung von THETs durch saure Hydrolyse von HEETs

#### Benötigten Materialien

Rotationsverdampfer (RV) (Büchi), Sintilations-Messgerät LS 6000SC (Beckman)

Ethanol: 99,9%ig, Ethylacetat, Acetonitril, Essigsäure 50%ig

#### Versuchsdurchführung

- 20-HEET-Suspension in RV-Röhrchen eindampfen
- in 50 µl Acetonitril aufnehmen
- 2 ml Essigsäure zusetzen
  - Inkubation: 2 h, 45°C, 200 rpm
- 1,5 ml H<sub>2</sub>O zugeben
- 2 ml Ethylacetat zugeben

- Zentrifuge: 10 min, 1100 rpm
- 2 ml Ethylacetat zugeben
  - Zentrifuge: 10 min, 1100 rpm
- Einengen im RV
- In Ethanol aufnehmen
- Quantifizierung am Sintilations-Messgerät

#### **2.2.4.4 Kontrolle des Verschneidungsverhältnisses**

Mittels LC-MS (vgl. Abschn. 2.5) wurde nicht nur die Reinheit des Standards, sondern auch deren Konzentration geprüft. Das Verhältnis aus  $[1-^{14}\text{C}]$ -HEET bzw.  $[1-^{14}\text{C}]$ -THET und den entsprechenden  $[1-^{12}\text{C}]$ -Substanzen wurde anhand der Peakflächen bestimmt und so das tatsächliche Verschneidungsverhältnis näherungsweise ermittelt.

### **2.3 Tierversuche**

Tierversuche wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Ratten und Mäusen in Einklang mit den Guidelines der Charité Berlin durchgeführt und durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin bestätigt:

- In Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dragun der Charité Berlin (vgl. 2.3.1.1) wurden Lewis-Ratten von Harlan-Winkelmann (Borchen, Germany) bezogen [112]
- Für Versuche der isolierten perfundierten Niere (2.3.1.2) wurden Wistar-Ratten von Charles River bezogen und gemäß LaGeSo-Genehmigung Y9018/11 verwendet.
- Mäuse vom Typ C57BL/6 wurden ausschließlich in der Zucht des MDC Berlin gehalten. Der Stamm der sEH-Knockout-Mäuse ist ein globaler, homozygoter Knockout und wurde ursprünglich von Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc etabliert [113] und ausgehend davon über 9 Generationen rückgekreuzt auf C57BL/6ByJ [114]. Die Mausstämme wurden gemäß LaGeSo-Genehmigung G0146/16 verwendet (vgl. 2.3.2). Sie wurden auch in Kooperation mit Dr. Ye Zhu für renale I/R-Versuche genutzt [123].

#### **2.3.1 Untersuchungen des ischämischen Nierenschadens**

##### **2.3.1.1 Ischämie-Reperfusion (I/R) an Ratten *in vivo***

In Kooperation mit der Charité-Arbeitsgruppe von Frau Prof. Duska Dragun wurden *in-vivo*-Versuche zur Nierenfunktion an Lewisratten durchgeführt. Diese Experimente erfolgten in einem weiter gefassten Rahmen und sollen innerhalb der vorliegenden Arbeit nur auszugsweise umrissen werden.



Zunächst wurde die rechte Niere der mittels Isofluran narkotisierten Ratten operativ entfernt (Uninephrektomie, UNX). Daraufhin wurde den Tieren Vehikel oder ein EET-Analog (60 µg) in die Aorta injiziert, das im Vergleich zu 14,15-EET eine Harnstoffgruppe an Stelle der Epoxidgruppe aufweist (vgl. Abbildung 3-2). 5 min später wurde die Niere durch Okklusion des Nierenstils über 45 min einer warmen Ischämie unterzogen. In einem Teil der Versuche schloss sich eine Phase der warmen Reperfusion über zwei Stunden an. Anschließend wurde das Tier mit 2% Isofluran narkotisiert, getötet und die linke Niere entnommen [112].

### **2.3.1.2 Ischämie der isolierten perfundierten Niere**

Um die Versuche zur Nierenfunktion innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. Schunck durchführen zu können, wurde eine bei der Omeicos GmbH Berlin vorhandene Langendorff-Organperfusionsapparatur auf die Anforderungen der Nierenperfusion abgestimmt und für Ischämie-Versuche an Rattennieren genutzt.

#### **Benötigte Materialien**

Nieren-Perfusionskammer: Moist Chamber Type 834/8 with metal tube heat exchanger (Hugo Sachs Apparatus GmbH)

Kanüle zur Kanülierung der Rattennieren-Arterie: 1,3 mm Außendurchmesser (Hugo Sachs Apparatus GmbH)

Langendorff Apparatur inkl. Schlauchpumpen und 1x 25 µm Polypropylenfilter (Hugo Sachs Apparatus GmbH)

Software für Druck- und Flussaufzeichnung (ISCHEART)

Thermo-Umlaufbad (Labortechnik Medingen)

Mikroskop

Präzisions-Präpbesteck (FST)

Carbogen-Gas

Perfusionspuffer (genaue Zusammensetzung folgend)

Tiermodell: Ratte (Wistar)

#### **Vorbereitung des Perfusionspuffers**

Als Blutersatz diente ein Puffer auf Basis der Krebs–Henseleit–Lösung. Eine Auswahl der für die Nierenfunktion besonders wichtigen Aminosäuren wurde jeweils frisch und einzelnen zugefügt, das Bereithalten von Stammlösungen der Aminosäuren hatte sich aus Gründen begrenzter Löslichkeit und Haltbarkeit nicht bewährt. Die Viskosität des natürlichen Blutes wurde anfangs mittels 6%igem Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA) erreicht. Nachteil von BSA war die störanfällige Handhabung (Klebrigkeit; starke Schaumbildung) und die Neigung, biologische Substanzen, etwa auch zugesetzte Wirkstoffe, zu binden und damit dem System zu entziehen. Deshalb wurde BSA teilweise durch Dextran ersetzt. Enthalten war im Puffer außerdem Mannitol als Diuretikum. Die Puffer-Zusammensetzung erfolgte orientiert an Beschreibungen in der Literatur für Nierenperfusionssysteme [115, 116].

Die Konzentrationen der gelösten Salz-Ionen im Puffer betrugen:  $\text{Na}^+$  (141 mM),  $\text{K}^+$  (5,4 mM),  $\text{Ca}^{2+}$  (3,0 mM),  $\text{Mg}^{2+}$  (2,44 mM),  $\text{HCO}_3^-$  (25,0 mM),  $\text{Cl}^-$  (126,0 mM),  $\text{PO}_4^{3-}$  (1,53 mM) und  $\text{SO}_4^{2-}$  (2,44 mM).

Für vier Perfusionsversuche wurden frisch in 1300 ml A.dest. folgende Salze gelöst, in aufsteigender Reihenfolge:

Salz	Einwaage (g)	M (g/mol)
NaCl	9,0	58,44
$\text{NaHCO}_3$	2,73	84,01
KCl	0,523	74,56
$\text{CaCl}_2$	0,57	147,02
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,78	246,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,27	136,09

800 ml davon wurden abgenommen, filtriert und auf pH = 7,4 mittels Salzsäure und Natronlauge eingestellt („Puffer A“). Zu den übrigen 500 ml („Puffer B“) wurden folgende Stoffe zugesetzt und mittels Magnetrührers vermischt, anschließend filtriert und auf pH = 7,4 eingestellt und auf Eis gestellt.

- **Puffer B:** 500 ml mit folgenden Stoffen versetzen:

Stoff	Einwaage (g)	Konz.i.A.
Mannitol	3,0	0,6 %
Glukose	0,5	0,1 %
BSA Fraktion V	3,25	0,65 %
Dextran, 70kDa *	18,0	3,6%
Met	37,3	0,5 mM
Ala	89,1	2 mM
Gly	187,7	5 mM
Ser	105,5	2 mM
Arg	105,3	1 mM
Pro	115,1	2 mM
Ile	65,6	1 mM
Asp	199,7	3 mM

\* =  $C_{\text{Dextran}}$  ergibt sich aus  $4/6 \cdot (6 - C_{\text{BSA}})$  [115]

### Vorbereitung der Langendorff-Apparatur

Das Thermo-Umlaufbad wurde gestartet, sodass sich die Apparatur auf 37 °C erwärmen konnte. 250 ml Puffer B wurden in ein großes Becherglas gefüllt, die Begasung mit Carbogengas gestartet.

Zunächst wurde das System bei geringem Fluss gespült, wobei der Puffer ablief und nicht rezirkulierte. Nach einem Verbrauch von 50 ml Puffer, wurde auf rezirkulierendes System umgestellt und 1 Stunde lang äquilibriert.

### **Präparation der Niere**

Wistar-Ratten wurden mittels 40 mg/kg Pentobarbital narkotisiert, wobei in der Lösung auch Heparin (1000 U; entspricht 1000 I.E.) enthalten war. Bei eventuell notwendiger Nachnarkotisierung, wurde kein weiteres Heparin zugegeben. Das Versuchstier wurde im Rumpfbereich eröffnet. Das Präparieren und Kanülieren des Ureters wurde nicht durchgeführt – dieser wurde lediglich nahe der Niere durchtrennt. Aorta und rechte Niere wurden grob freipräpariert. Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und der gesamte Organismus über das Herz mit körperwarmem Puffer A gespült, bis die Niere ihre rote Farbe vollständig verloren hatte. Die Spritze mit der Pufferlösung wurde dabei manuell bedient, wobei nur sanfter Druck ausgeübt wurde, um Organschädigung zu vermeiden. Es folgte das Durchtrennen von Aorta und Vena cava unterhalb und oberhalb der freipräparierten Niere. Die Niere wurde mit dem verbliebenen Aorta-Stück dem Tier entnommen und sofort in eine Schale mit eiskaltem Puffer A übergeführt.

Unter dem Mikroskop erfolgte nun mittels Präzisionsbesteck die Präparation der Arteria renalis, wobei auf die Erhaltung eines ausreichend langen Stückes der Aorta geachtet wurde. Es diente zur Erleichterung der Kanülierung der A. renalis mittels 24-G-Kanüle, die zweifach mittels OP-Bindfaden (surgical suture) fixiert wurde. Abschließend wurde die Niere in der Perfusionskammer auf einem Drahtgitter über einem flachen Trichter platziert, sodass ausströmendes Perfusat nach unten ablaufen und direkt abgepumpt werden konnte. Die Kanüle wurde luftblasenfrei an die Langendorff-Apparatur angeschlossen.

### **Isolierte perfundierte Niere**

In der Einlaufphase wurde der Perfusionsdruck im Verlauf von 10 min schrittweise auf 90-110 mm Hg erhöht, indem die Flussrate stufenweise erhöht wurde. Da sich in dieser Phase noch Blutbestandteile in der Niere befanden, wurde der Durchfluss nicht zurück in das Vorratsglas geführt, sondern in einen Ablauf. Nach Erreichen eines stabilen Flusses von 15 – 40 ml/min, wurde auf rezirkulierendes System umgestellt, um den Verbrauch an Perfusionspuffer in Grenzen zu halten, aber auch zur Hemmung von Auswaschungs-Effekten der Niere. Messungen des Urinflusses, der Glucose- und Salzreabsorption und der glomerulären Filtrationsrate wurden nicht durchgeführt. Die Niere wurde für stabil befunden und in den Versuch genommen, wenn einerseits die genannten Druck- und Flussparameter erreicht wurden, und andererseits die charakteristische Autoregulation der Flussrate durch die Niere deutlich und wiederholt nachweisbar war (Leichtes Absinken der Flussrate bei konstantem Druck ab ca. 70 mm Hg). Für die Planung der Versuche zeigte sich in der Routineanwendung eine Nieren-Ausfallquote von etwa 20% als realistisch.

Die Ischämie wurde nach etwa 20 min Äquilibration der Niere, durch Stopp des Flusses, ausgelöst und dauerte 40 min. Anschließend wurde die Niere aus der Kammer entnommen, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Kontrollnieren wurden 60 min perfundiert.

### **2.3.2 Fütterungsversuche an gentechnisch veränderten Mäusen**

Um die biologische Funktion und Relevanz der löslichen Epoxid Hydrolase (sEH) in Abhängigkeit von der Ernährung zu untersuchen, wurden ein sEH-knockout-Stamm und ein sEH-Wildtyp-Stamm neben Normalfutter-Haltung mit einer omega-3- oder omega-6-fettsäurereichen Diät ernährt.

#### **Tierhaltung und Tierversuch**

Die Mäuse der verschiedenen Genotypen einschließlich der Wildtypen (WT) wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gehalten, unter Berücksichtigung eines 12:12 h – hell-dunkel-Zyklus und Zugang zu Wasser und Futter ad libitum. Die Diäten wurden über einen Zeitraum von drei Wochen durch Supplementierung des Normalfutters mit ssniFF EF R/M + 5% Sonnenblumen-Öl + 2.5% Omacor oil, oder ssniFF EF R/M + 5% Sonnenblumen-Öl durchgeführt. In die Versuche waren ausschließlich männliche Tiere eingeschlossen, diese waren zu Beginn der Spezialfütterung 10-13 Wochen alt. Es wurden Versuchsgruppen mit jeweils 8 Tieren gebildet, um die minimalen Voraussetzungen für eine ausreichende Reproduzierbarkeit und statistische Relevanz der Ergebnisse zu erreichen.

Zur Organentnahme wurden die Tiere zunächst mittels Ketamin/Xylazin (240 mg/kg) narkotisiert, 220 I.E./kg Heparin appliziert und nach Eintreten der Bewusstlosigkeit durch zervikale Dislokation getötet. Herz, Leber, Niere, Lunge und etwa 0,5 ml Blut der Tiere wurden entnommen. Unmittelbar darauf wurde durch Zentrifugation (10 min, 10 000 g) das Plasma des Blutes gewonnen. Die Eicosanoide wurden später entsprechend der Präparation laut Abschnitt 2.1.4 extrahiert und mittels Chiralphasen-LC-MS/MS entsprechend Abschnitt 2.5 analysiert.

#### **Genotypisierung**

Der homozygote sEH-Genotyp von Jungtieren aus der Zucht wurde mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) und geeigneter Primer kontrolliert. Ohrstücke von etwa 2 mm Durchmesser wurden als Probenmaterial verwendet und zunächst lysiert, mittels PCR amplifiziert und im Agarose-Gel nachgewiesen.

#### **Benötigte Materialien**

Heizblock (Test Tube Thermostat TCR 100 (Roth))

PCR-Apparatur (Gene Pro Thermal Cycler (Biozym))

Agarose-Gellauf-Apparatur Horizon 58 Modell 200 (Life Technologies)

Mikrowelle (haushaltsüblich)

UV-Detektor (Biometra) und Software zur Auswertung (BioDocAnalyze 1.8.12.4)

## Benötigte Chemikalien

PCR-Kit (PEQLAB, 01-1320 PCR Master Mix)

Primer: (BioTeZ Berlin-Buch GmbH)

für Stamm sEH-KO:

„SEPOH5“: CCA CCT ACC TTG TGC TTG CC

“SEPOH3”: GGG AAG AGG GGA AGG ATT GT

Lyse-Puffer: 100mM Tris/HCl pH 8,5, 5mM EDTA, 200mM NaCl, 0,2% SDS

TE/RNase Puffer: 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 1 mM EDTA + 20 µg/ml RNase

Proteinkinase K, Stammlösung: 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O

TAE-Puffer: 40mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, in H<sub>2</sub>O, pH = 8,0

Loading buffer: Blue/Orange 6x loading Dye (PR omega)

Ladder: 100bp (Invitrogen)

Agarose (high resolution) für <1000 bp (Roth)

Gel-Red: Nucleic Acid Gel stain 10000x (Biotium)

Die Ohr-Proben wurden im 1,5 ml-Reagiergefäß mit 100 µl Lyse-Puffer und 10 µl Proteinkinase K versetzt und über Nacht bei 55°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde gebildetes Kondenswasser heruntergeklopft und es erfolgte die Inaktivierung der Proteinkinase K durch Inkubation bei 95°C für 5 min. Danach wurden 750µl TE/RNase-Puffer zugegeben und vorsichtig vermischt. Die Proben wurden dann auf Eis gestellt oder bei -20°C eingelagert. Für die PCR wurde 1 µl genomischer DNA mit 10 µl PCR-Mastermix, 5 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl geeigneter Primer versetzt. Als Kontrollen wurden H<sub>2</sub>O sowie eine Probe ohne Lysat mitgeführt. Die PCR lief über 40 Zyklen mit jeweils 30 s 95 °C; 30 s 55 °C und 45 s 72 °C. Es schloss sich ein Lauf mit 2%igem Agarose-Gel an. Für den Lauf wurden 3 µl des PCR-Produkts mit 2 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Loading Dye versetzt und in die Slots im Gel pipettiert. Als Referenz wurde eine Probe mit 0,1 µg Ladder anstatt des PCR-Produkts ergänzt. In der Einstellungen „low“ wurde das Gel in der Apparatur bei 100 V etwa 20 min laufen gelassen, bis die gelbe Bande des Loading Dyes am anderen Ende des Gels angelangte. Das Gel wurde für 15 min im Dunkeln unter Schwenken mittels Gel-Red (3fach in H<sub>2</sub>O) gefärbt und anschließend in einfachem TAE-Puffer gewaschen. Die Banden der DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels geeigneter Software in der Sichtbarkeit optimiert und anschließend ausgedruckt. Die genotyp-spezifischen PCR-Produkte wiesen eine Länge von 308 bp (homozygoter Wildtyp) und 230 bp (homozygoter sEH-Knockout) auf und wurden anhand der Banden des Ladders zugeordnet.

## **2.4 Achirale Chromatografische Methoden**

### **2.4.1 Allgemeines zur Analytik mit $^{14}\text{C}$ - und UV-Detektor**

Die Synthese von Standards kommerziell nicht verfügbarer Eicosanoide wie der HEETs und THETs erforderte eine radioaktive Markierung (vgl. Abschn. 2.2.4) und entsprechende Präparation mittels reverser- und normalphasen- High Performance Liquid Chromatografie (HPLC), die mit einem  $^{14}\text{C}$ -Detektor gekoppelt wurde. Zur quantitativen Gewinnung und Identifizierung enantiomerer Standards von Monoepoxiden war es zudem erforderlich, UV-gekoppelte, chirale normalphasen-Chromatografie zu betreiben. Die HPLC – Apparatur stammte von Shimadzu und setzte sich aus zwei LC-10AD – Pumpen, dem Probengeber SIL-10AD, dem Säulenofen CTO-10ASm, dem Systemcontroller SCL-10A, einem Degasser DGU-14A und dem UV-Detektor SPD-M10A zusammen. Die Detektion der radioaktiv markierten Proben erfolgte mittels Radioflow Detektor LB509 (EG&G Berthold). Als PC – Software diente LabSolutions (Shimadzu). Aufgrund der präparativen Zwecke, wurden grundsätzlich Säulen mit 250 mm Länge, 4,6 mm Innendurchmesser (ID) und 5  $\mu\text{M}$  Partikeln verwendet.

### **2.4.2 Verwendete Säulen und Methoden**

#### **Reverse Phase HPLC zur Präparation von Monoepoxiden und Monohydroxiden**

Folgende Säule kam zum Einsatz: CC250/4 Nucleosil 100-5  $\text{C}_{18}$  HD mit Vorsäule CC8/4 Nucleosil 100-5  $\text{C}_{18}$  HD von Marcherey-Nagel. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Acetonitril, Wasser und Essigsäure verwendet (50:50:0,1 (vol:vol:vol)). Als linearer Gradient wurde der Anteil des Acetonitrils innerhalb 40 min von 50 % auf 100 % hochgefahren und anschließend 10 min bei 100 % gehalten. Zur Äquilibration lief die Säule weitere 10 min mit dem Ausgangsgemisch. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Retentionszeiten siehe Tabelle 2-2.

#### **Normalphase zur Trennung der EET – Regioisomere**

Folgende Säule kam zum Einsatz: CC250/4 Nucleosil 100-5 mit Vorsäule CC8/4 Nucleosil 100-5 von Marcherey-Nagel. Die durch chemische Epoxidation gewonnenen  $^{14}\text{C}$ -markierten EETs wurden zur HEET – Synthese in ihre Regioisomere aufgetrennt. 14,15-EET und Nebenprodukte wurden bereits in der Reversphase abgetrennt. Zur Trennung der 11,12 – 5,6-EET-Fraktion wurde ein isokratischer Lauf mit Hexan, Isopropanol und Essigsäure (99,6:0,4:0,1) durchgeführt. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min. Retentionszeiten siehe Tabelle 2-2.

#### **Normalphase zur Trennung von 19- und 20-HEET Regioisomeren**

Folgende Säule kam zum Einsatz: CC250/4 Nucleosil 100-5 mit Vorsäule CC8/4 Nucleosil 100-5 von Marcherey-Nagel. Nach der enzymatischen Hydroxylierung der EETs (vgl. Abschn. 2.2.4) wurde 20-OH-EET von subterminal hydroxylierten Produkten abgetrennt. Gearbeitet wurde dazu mit einem

Gemisch aus Hexan, Isopropanol und Essigsäure (99:1:0,1). Über einen 60-minütigen, linearen Gradienten wurde die Hexan-Konzentration von 99,5% auf 96,5%, beziehungsweise 90 % für Trennung von 19/20-OH-14,15-EET, herabgesetzt. Nach 10 minütiger Spülung mit 90% Hexan wurde die Säule wieder mit 99,5% Hexan äquilibriert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Retentionszeiten siehe Tabelle 2-2.

**Tabelle 2-2 Retentionszeiten der AA-Metaboliten in der achiralen RP- und NP-HPLC**

	RP-HPLC	NP-HPLC Epoxide	NP-HPLC Hydroxide	NP-HPLC 19/20-OH-14,15-EET
19-OH-8,9-EET	~ 9 min		53,9 min	
19-OH-11,12-EET			49 min	
19-OH-14,15-EET				26 min
20-OH-8,9-EET			59 min	
20-OH-11,12-EET			54 min	
20-OH-14,15-EET				33 min
16-18-HETE	~ 15 min		8,5 min	
19-HETE	~ 16 min		14 min	
20-HETE			19 min	
14,15-EET	23,5 min			
11,12-EET	~ 25,5 min	9,5 min		
8,9-EET		12,5 min		
5,6-EET		18,5 min		
AA	33,7 min			

### **2.4.3 Polysaccharidbasierte Chiralphasen-HPLC**

Einige Monohydroxide und alle Monoepoxide waren nur als Racemate kommerziell erhältlich, die Enantiomere mussten daher präpariert werden. Dies erfolgte für 18-HEPE, 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EEQ und 19,20-EDP. Zur präparativen Gewinnung wurde UV-gekoppelte Chiralphasen-HPLC unter Normalphase-Bedingungen betrieben. Als Stereoselektor der Säule kam das Polysaccharid Cellulose zur Anwendung, dessen Hydroxylgruppen mit einem benzolhaltigen Baustein derivatisiert wurden. Die Oberfläche ist eher polar. Eine Besonderheit stellt die Tatsache dar, dass die Polysaccharide nicht kovalent mit dem Silicagel verbunden sind, sondern lediglich aufgeschichtet („coated“) vorliegen, siehe Abschnitt 1.6. Dies begrenzt den möglichen Arbeitsdruck dieser Säulen auf maximal 300 Bar, und starke Druckschwankungen schaden dem Material. Da unter den gewählten Normalphase-Bedingungen der Druck stets deutlich unter 100 Bar blieb, traten hierbei jedoch keine Schwierigkeiten mit der Säulenstabilität auf.

### **Chirale Normalphase zur Trennung von Stereoisomeren (außer 17,18-EEQ und 19,20-EDP)**

Folgende Säule kam zum Einsatz: Chiralcel-OD von Daicel. Zur Trennung wurde ein isokratischer Lauf mit Hexan, Isopropanol und Essigsäure entsprechend der Literatur durchgeführt [117], aus der sich auch die Identität der EET-Enantiomere ergab. Für EEQs, EDPs und Monohydroxide wurde die Laufmittelzusammensetzung in geeigneter Weise angepasst und die Identität der präparierten Enantiomere blieb unklar.

### **Chirale Normalphase zur Trennung der Stereoisomere von 17,18-EEQ und 19,20-EDP**

Aufgrund nicht ausreichender Trennung auf der Chiralcel-OD-Säule, wurde für 17,18-EEQ und 19,20-EDP die Säule Chiralcel-OB (Daicel) verwendet, die einen weniger polaren Liganden besitzt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Hexan, Isopropanol und Essigsäure verwendet (99,5:0,5:0,1 (vol:vol:vol)) und isokratisch getrennt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Identität der 17,18-EEQ-Enantiomere ergab sich aus der Literatur [118] und für 19,20-EDP wurde angenommen, dass die Elutionsreihenfolge der Enantiomere unter gleichen Laufbedingungen entsprechend der 17,18-EEQ-Enantiomere ist.

## **2.4.4 Achirale Chromatografie mit Single-Quad-MS-Detektion**

Eine LC-MS-Anlage wurde verwendet, um geeignete Säulen, Laufmittel und andere Bedingungen zur späteren Anwendung an der Chiralphasen-LC-MS/MS zu erforschen. Ferner wurde eine achirale LC-MS-Methode etabliert, die es im Unterschied zur LC-UV ermöglicht, um etwa Faktor 1000 sensitiver zu messen, sodass wesentlich weniger Material für Substanzbestimmungen oder Reaktionsansätze benötigt wird, und auf das Arbeiten mit radioaktivem Material vielfach verzichtet werden kann. Für präparative Zwecke ist diese Methode hingegen nicht geeignet.

Die HPLC – Apparatur stammte von Shimadzu und setzte sich aus zwei LC-10AD – Pumpen, dem Probengeber SIL-10AD, dem Säulenofen CTO-10AS, dem Systemcontroller SCL-10A und einem Degasser DG 1310 zusammen. Die Detektion erfolgte mittels LCMS 2010EV (Shimadzu). Als Auswertungs-Software diente LCMS-Solutions (Shimadzu). Es wurden grundsätzlich Säulen der Maße 150x2 mm mit 3 µm Partikeln verwendet. Die Chromatografie erfolgte stets mittels Reversphasen-Gradiententrennung bei einer Temperatur von 40°C. Das Injektionsvolumen betrug stets 10 µl.

### **RP-LC-MS zur achiralen Analyse von Fettsäuren und Eicosanoiden**

Folgende Säule kam zum Einsatz: Luna C18(2) mit Vorsäule Security Guard C18 4x2 mm von Phenomenex. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Acetonitril, Wasser und Essigsäure verwendet (50:50:0,05 (vol:vol:vol)). Als linearer Gradient wurde der Anteil des Acetonitrils innerhalb 40 min von 50 % auf 100 % hochgefahren und anschließend 10 min bei 100 % gehalten. Aufgrund der geringen Flussrate, war stets eine Äquilibration über 30 min erforderlich. Der Druck lag während der Äquilibration bei 135 Bar. Retentionszeiten siehe Tabelle 2-3.



**Tabelle 2-3 Retentionszeiten verschiedener Oxylipine in der achiralen LC-MS-Analytik**

<b>AA-Metabolit</b>	<b>Retentionszeit (min)</b>	<b>EPA-Metabolit</b>	<b>Retentionszeit (min)</b>	<b>DHA-Metabolit</b>	<b>Retentionszeit (min)</b>
<b>THETs</b>	4-5	<b>17,18-DiHETE</b>	10,7	<b>19,20-DiHDPA</b>	15,9
<b>HEETs</b>	9-10	<b>14,15-DiHETE</b>	12,5	<b>16,17-DiHDPA</b>	18,2
<b>14,15-DHET</b>	16,3	<b>11,12-DiHETE</b>	13,3	<b>13,14-DiHDPA</b>	18,9
<b>11,12-DHET</b>	18,8	<b>5,6-DiHETE</b>	16,2	<b>10,11-DiHDPA</b>	20,1
<b>8,9-DHET</b>	20,6			<b>7,8-DiHDPA</b>	22,2
<b>19/20-HETE</b>	22-23	<b>20-HEPE</b>	19,6	<b>20-HDHA</b>	26,1
<b>16-18-HETE</b>	23,5-24,5	<b>18-HEPE</b>	21,2	<b>17-HDHA</b>	27,7
<b>5...15-HETE</b>	27 - 30,5	<b>5...15-HEPE</b>	23...25.5	<b>10...14-HDHA</b>	28,5...29
<b>14,15-EET</b>	32,8	<b>17,18-EEQ</b>	27,8	<b>19,20-EDP</b>	32,2
<b>5,6...11,12-EET</b>	34...35	<b>8,9...14,15-EEQ</b>	29.5...30.5	<b>7,8...16,17-EDP</b>	33...34,5
<b>AA</b>	43,7	<b>EPA</b>	39,6	<b>DHA</b>	42,6

## **2.5 Chirale Chromatografie-gekoppelte Massenspektrometrie**

Ein Kernbestandteil der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer MS-gekoppelten Chiralphasen-Analytik von Eicosanoid-Gemischen. Die Methodenentwicklung wie auch deren Validierung ist im Ergebnisteil abgehandelt.

### **RP-LC-MS zur chiralen Analyse von Eicosanoiden**

Diese Methode diente für Vorarbeiten zur Etablierung der Chiralphasenanalytik mittels MS/MS, eignet sich in der Verbindung mit Single-Quad-MS jedoch grundsätzlich auch zur Bestimmung von Enantiomeren-Gemischen *in vitro*, die sich chromatografisch vollständig trennen lassen und keine hochsensitive Detektion erfordern. Hierzu wurden die Polysaccharid-beschichteten chiralen Säulen Cellulose-3 und Amylose-1 von Phenomenex mit wässrigem Laufmittel betrieben. Dabei kann nicht grundsätzlich von Reversphasen-LC gesprochen werden, da die Oberfläche der Polysaccharid-Säulen nicht so unpolar ist, wie das für klassische RP-Chromatografie erforderlich ist. Nur wenn der wässrige Anteil im Laufmittel überwiegt, bestehen hierbei tatsächlich RP-Bedingungen. Bei höherem Organikanteil geht das Trennprinzip über zu Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)-artigen Bedingungen, und oberhalb von 80% Organikanteil liegen sogar NP-artige Trennbedingungen vor. Diese Besonderheit hat zur Folge, dass sich Retentionszeiten in Beziehung zur Polarität des Laufmittels nicht so verhalten, wie das aus der theoretischen Betrachtung der RP-Chromatografie heraus zu erwarten wäre. Entscheidend ist bei diesen Phasen auch die Säulentemperatur. Die angegebene Identität der Enantiomere gilt deshalb lediglich für Chromatografie mit den genannten Säulen, Laufmitteln, Gradienten und Säulentemperatur (40°C).

Für die Methode „Cellulose-3“ kam folgende Säulen zum Einsatz: Lux-Cellulose-3 mit Vorsäule Security Guard Cellulose-3 4x2 mm von Phenomenex. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Methanol, Wasser und Essigsäure verwendet (70:50:0,05 (vol:vol:vol)), wobei die Essigsäure lediglich dem Wasser beigemischt wurde und daher in ihrer Konzentration nicht konstant war. Dies war erforderlich, da die Säure mit Methanol relativ schnell verestert. Einem linearen Gradienten folgend, erhöhte sich die Methanol-Konzentration auf 100% innerhalb von 40 min. Nach 10 Minuten Spülzeit, wurde 30 min äquilibriert. Der Druck lag während der Äquilibration bei 48 Bar.

Für die Methode „Amylose-1“ kam folgende Säulen zum Einsatz: Lux-Amylose-1 mit Vorsäule Security Guard Cellulose-3 4x2 mm von Phenomenex. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Acetonitril, Methanol, Wasser und Essigsäure verwendet (27:3:70:0,05 (vol:vol:vol)). Einem linearen Gradienten folgend, erhöhte sich der Organikanteil auf 100% innerhalb von 60 min. Nach 10 Minuten Spülzeit, wurde 30 min äquilibriert. Der Druck lag während der Äquilibration bei 120 Bar.

Eine Auflistung der Retentionszeiten aller geprüften Metaboliten, sowie Einzelheiten zur Entwicklungsarbeit an der Single-Quad-MS, die zu den genannten beiden Methoden führte, sind in Abschnitt 3.2.1 dargestellt.

### **Chirale LC-MS/MS**

Die gefunden Bedingungen wurden als Grundlage dafür genommen, die Chiralphasen-Eicosanoid-Analytik in Zusammenarbeit mit der Lipidomix GmbH Berlin auf ESI-Tandem-Massenspektrometrie anzuwenden. Dazu wurde den chiralen Säulen noch jeweils eine kurze RP-Säule vorgeschaltet und der Gradient auf kürzere Retentionszeiten hin optimiert. Da dieser Entwicklungsschritt eine zentrale Leistung der vorliegenden Arbeit ist, wird darauf im Ergebnisteil ausführlich eingegangen.

## **2.6 Statistik**

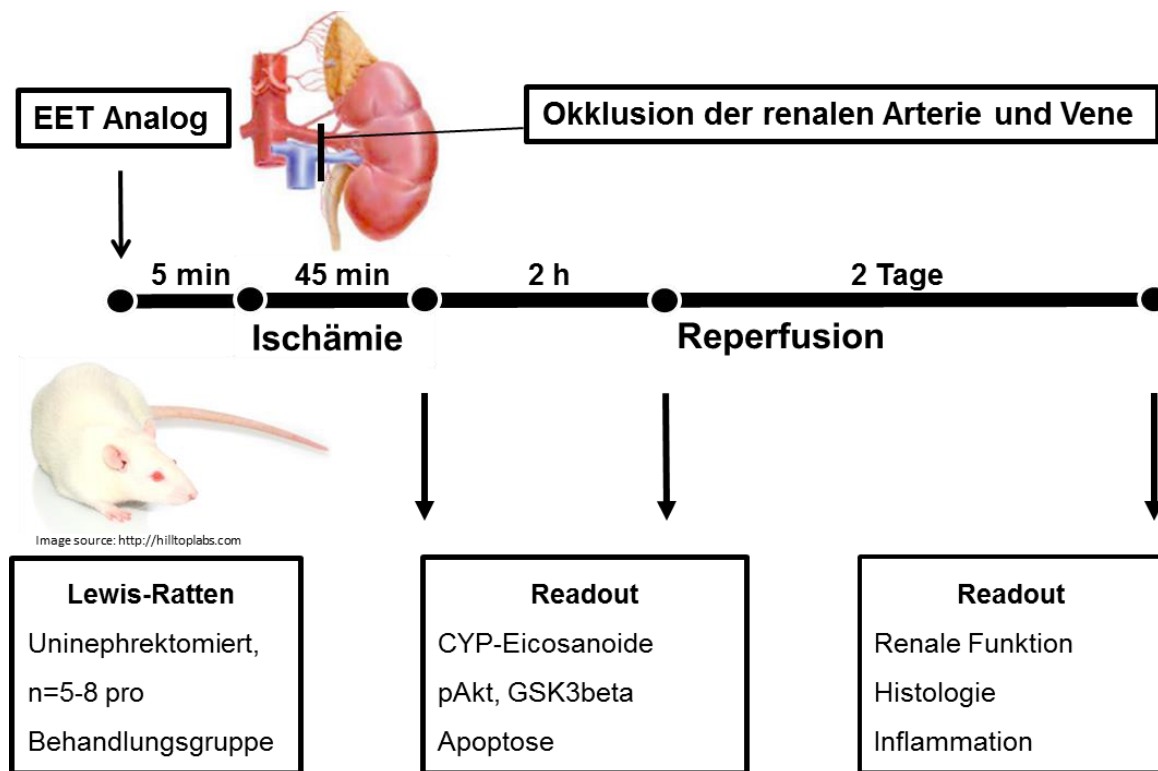
Die statistische Auswertung wurde mittels GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. War die n-Zahl kleiner als 6, erfolgte der statistische Test nichtparametrisch (Mann-Whitney U-test bzw. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns post-test für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen). Bei größeren n-Zahlen wurden die Daten mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft und gegebenenfalls parametrisch getestet (t-test oder ANOVA mit Bonferroni-post-test). Bei Vergleich von zwei Gruppen, wurde grundsätzlich two-tailed getestet. Ein Signifikanzwert von  $P < 0,05$  wurde als signifikant eingeschätzt. Für *in vivo*- und *ex vivo*-Versuche wurden als Mittelwert  $\pm$  standard error of the mean (SEM) dargestellt, sowie Mittelwert  $\pm$  standard deviation (SD) im Falle von *in vitro* Versuchen. Korrelationsanalysen wurden entsprechend der Verteilung der Stichprobe nach Pearson durchgeführt.

# **3. Ergebnisse**

### **3.1 Rolle der CYP-Eicosanoide bei ischämischem Organschaden**

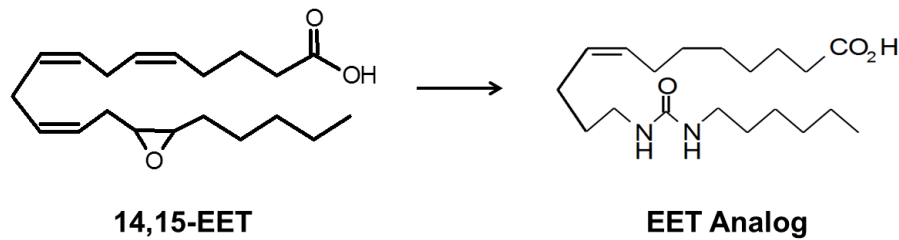
Entsprechend der ersten Zielstellung der vorliegenden Arbeit, wurden die CYP-Eicosanoide auf metabolischer Ebene an geeigneten Modellsystemen des akuten Nierenversagens untersucht. Die Zusammenarbeit mit der Gruppe Dragun der Charité Berlin ermöglichte dabei Untersuchungen am Ischämie-Reperusionsmodell uninephrektomierter Ratten [112]. Dabei wurde eine starke Erhöhung der freien 20-HETE und DHET-Level beobachtet, während die EETs kaum erhöht waren. In Gegenwart eines EET-Analogs verringerte sich der I/R-Schaden deutlich, und nach zwei Stunden Reperfusion bewirkte es zudem einen deutlichen Anstieg der freien EETs auf ein Niveau, das weibliche Tiere bereits in der Vehikelkontrolle aufwiesen (Kapitel 3.1.1). Weiterhin wurde ein System der isolierten perfundierten Niere aufgebaut und dessen Stabilität über 60 min Perfusion demonstriert. Der Effekt der Ischämie wurde anhand der CYP-Eicosanoide analysiert (Kapitel 3.1.2). Das Eicosanoid-Profil in Plasmen von Patienten offener Herzoperationen der Charité Berlin wurde in Hinblick darauf analysiert, ob bei Patienten mit nach OP aufgetretener AKI präoperativ abweichende Eicosanoid-Level vorlagen, was für 20-HETE und 8,9-EET signifikant der Fall war. Die sEH-Aktivität veränderte sich dabei nicht signifikant (Kapitel 3.1.3). Die Bedeutung des Sekundär-Metabolismus‘ der CYP-Eicosanoide (Kapitel 3.1.4) wurde in Kooperation mit Ye Zhu anhand von I/R-Versuchen an den Nieren von sEH-Knockout-Mäusen untersucht, wobei überraschend ein stärkerer I/R-Schaden in der Knockout-Gruppe festgestellt wurde. Zudem wiesen die Nieren dieser Tiere kaum verringerte DHET-Level auf. Eine andere Kaskade der Metabolisierung wurde durch den Einschluss von 20-HEETs und 20-THETs in die Analytik untersucht. In freier Form erhöhten sich diese bei I/R-Versuchen in Ratten ebenso wie in der isolierten perfundierten Niere in der Ischämie-Phase signifikant, und bei Weibchen noch stärker als bei den Männchen.

### 3.1.1 Akutes Nierenversagen: Modellversuche *in vivo*



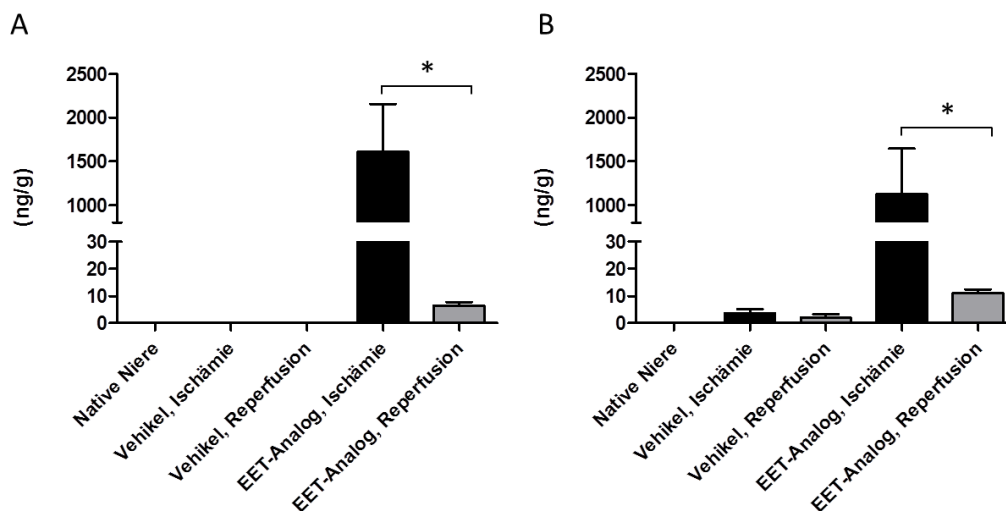
**Abbildung 3-1 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der warmen Ischämie/Reperfusion an Ratten [112]**

Zur Modellierung der Pathophysiologie, wie sie bei akutem Nierenversagen auftritt, wurde in Zusammenarbeit mit der AG Dragun der Charité Berlin Lewis-Ratten die rechte, „native“ Niere entnommen und die linke Niere durch Gefäßokklusion von der Blutversorgung abgeschnitten (Abbildung 3-1). Die warme Ischämie wurde bei 37°C über 45 min beibehalten. Zur Einleitung der Reperfusion wurde die Blutversorgung wiederhergestellt. Neben zahlreichen weiteren Readouts, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit totale und freie CYP-Eicosanoide in Nieren bestimmt, die nach Ischämie oder 2 Stunden Reperfusion entnommen wurden (Kontrollgruppe: rechte Niere). Abb. 3-2 zeigt die Strukturformel eines EET-Analogs, bei dem die Epoxidgruppe von 14,15-EET durch eine metabolisch stabilere Harnstoffgruppe ersetzt wurde. Dieses wurde männlichen Ratten durch Injektion in die Nierenarterie 5 min vor Induktion der Ischämie appliziert. Dieses EET-Analog wurde von Prof. Dr. Falck (UTSW, Dallas, USA) synthetisiert und zur Verfügung gestellt [119].



**Abbildung 3-2 Strukturformel des verwendeten EET-Analogs, bei dem es sich um ein Derivat von 14,15-EET handelt [119]**

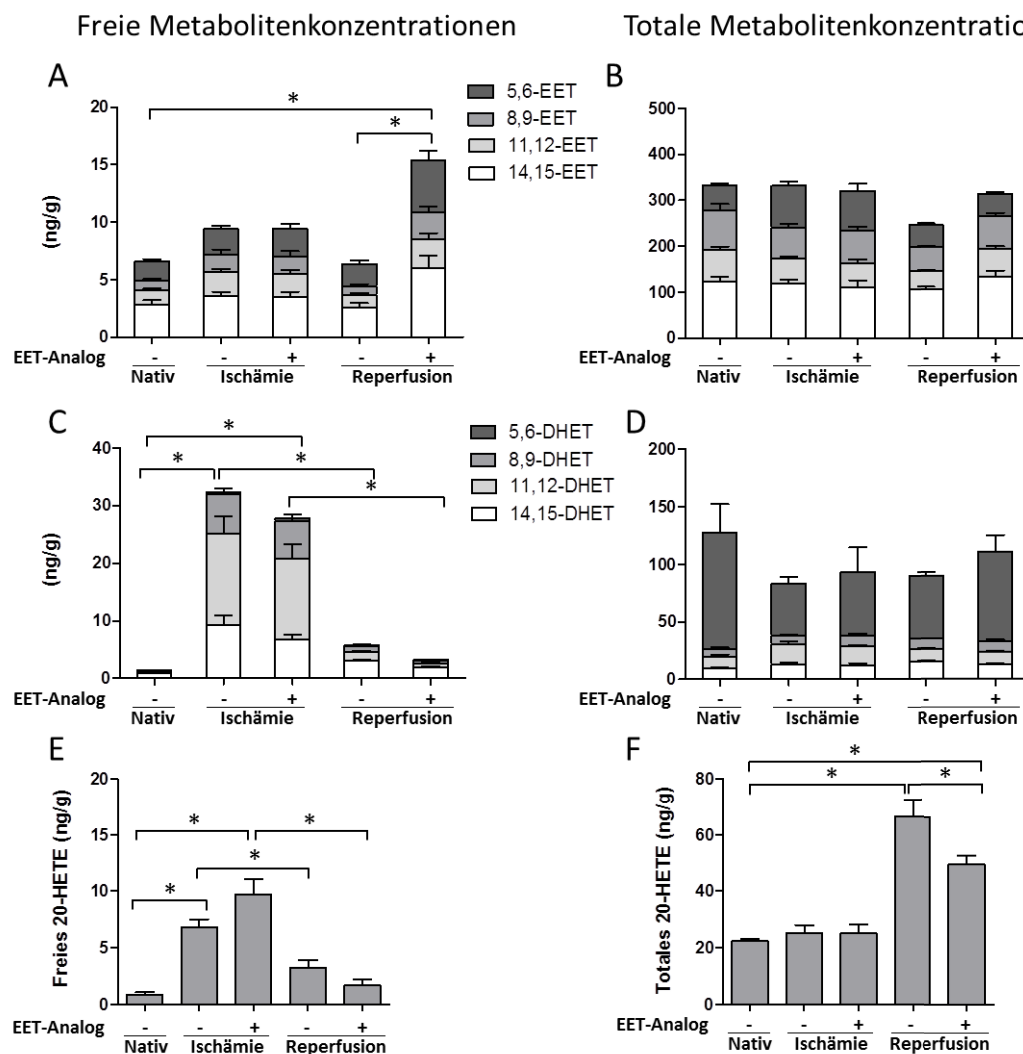
Aus Abb. 3-3 geht hervor, dass das Analog zum Ende der Ischämie in großer Menge in den Nieren der behandelten Tiere in freier Form vorlag, wobei die Streuung mit Werten zwischen 90 und 3900 ng/g sehr groß war. Der Mittelwert entsprach einer Konzentration von etwa 5  $\mu\text{M}$  in der Niere. Im Verlauf der Reperfusion wurde das Analog in allen Fällen weitgehend ausgewaschen. Der Einbau in Membranen erfolgte dabei in keinem relevanten Maße, wie die in Abb. 3-3 B gezeigte Analyse der Nieren nach alkalischer Hydrolyse belegte.



**Abbildung 3-3 Renale Konzentration des EET-Analogs im I/R-Versuch**

EET-Analog (60  $\mu\text{g}$ ) oder Vehikelkontrolle (1% DMSO in 100  $\mu\text{l}$  physiologischer Kochsalzlösung) wurde männlichen Lewis-Ratten entsprechend Abb. 3-1 appliziert. Native (rechte) Nieren, sowie Nieren entnommen nach Ischämie oder nach zwei Stunden Reperfusion, wurden entsprechend Abschn. 2.1.4 extrahiert und mittels achiraler LC-MS/MS analysiert. Gezeigt ist die gemessene Menge EET-Analog pro Feuchtmasse, A) ohne Hydrolyse und B) mit alkalischer Hydrolyse. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt ( $n=6-8$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p<0,05$  (One-Way-ANOVA, Bonferroni-Post-Test).

Die Analyse der CYP-Eicosanoide (Abbildung 3-4) zeigte, dass in ischämischen Nieren männlicher Ratten keine signifikant höheren Level der freien EETs, jedoch stark erhöhte Diol-Level vorlagen. Dies legt den Schluss nahe, dass es zwar zu einer Freisetzung von EETs aus den Membranen oder verstärkter Synthese von EETs kam, diese jedoch rapide hydrolysiert wurden. Sehr deutlich war die Freisetzung von 20-HETE während der Ischämiephase zu beobachten. Das Verhältnis von freiem 20-HETE zu freien EETs verschob sich verglichen mit nativen Nieren von 0,1:1 auf 0,7:1, und auf 1:1 in mit EET-Analog behandelten Nieren.



### Abbildung 3-4 Verschiebung des CYP-AA-Eicosanoidmusters nach Ischämie, Reperfusion und Behandlung mit EET-Analog *in vivo*

Männliche Lewis-Ratten wurden einem Versuchsablauf entsprechend Abb.3-1 unterzogen. Native (rechte) Nieren, sowie Nieren entnommen nach Ischämie oder nach zwei Stunden Reperfusion, wurden entsprechend Abschn. 2.1.4 extrahiert und mittels achiraler LC-MS/MS analysiert. Gezeigt ist die gemessene Menge CYP-AA-Eicosanoid pro Feuchtmasse, A) freie EETs B) totale EETs, C) freie DHETs, D) totale DHETs, E) freies 20-HETE, F) totales 20-HETE. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=6-8). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (One-Way-ANOVA, Bonferroni-Post-Test).

Nach zwei Stunden Reperfusion erfolgte die Freisetzung der Metaboliten aus den Membranen bereits nicht mehr, was deren vermutete Bedeutung als initialer Bestandteil einer pathophysiologischen Signaltransduktionskette unterstreicht. Ein anderer Befund ergab sich in Gegenwart des EET-Analogs. Während der Rückgang freien 20-HETEs davon unberührt bleibt, erhöhten sich die Level der freien EETs um das 1,6fache. Das EET-Analog wirkte somit nicht nur als EET-Agonist, sondern verstärkte auch die Bildung oder Freisetzung von EETs. Das Verhältnis der EET-Regioisomere zueinander änderte sich dabei nicht (Abb.3-4).

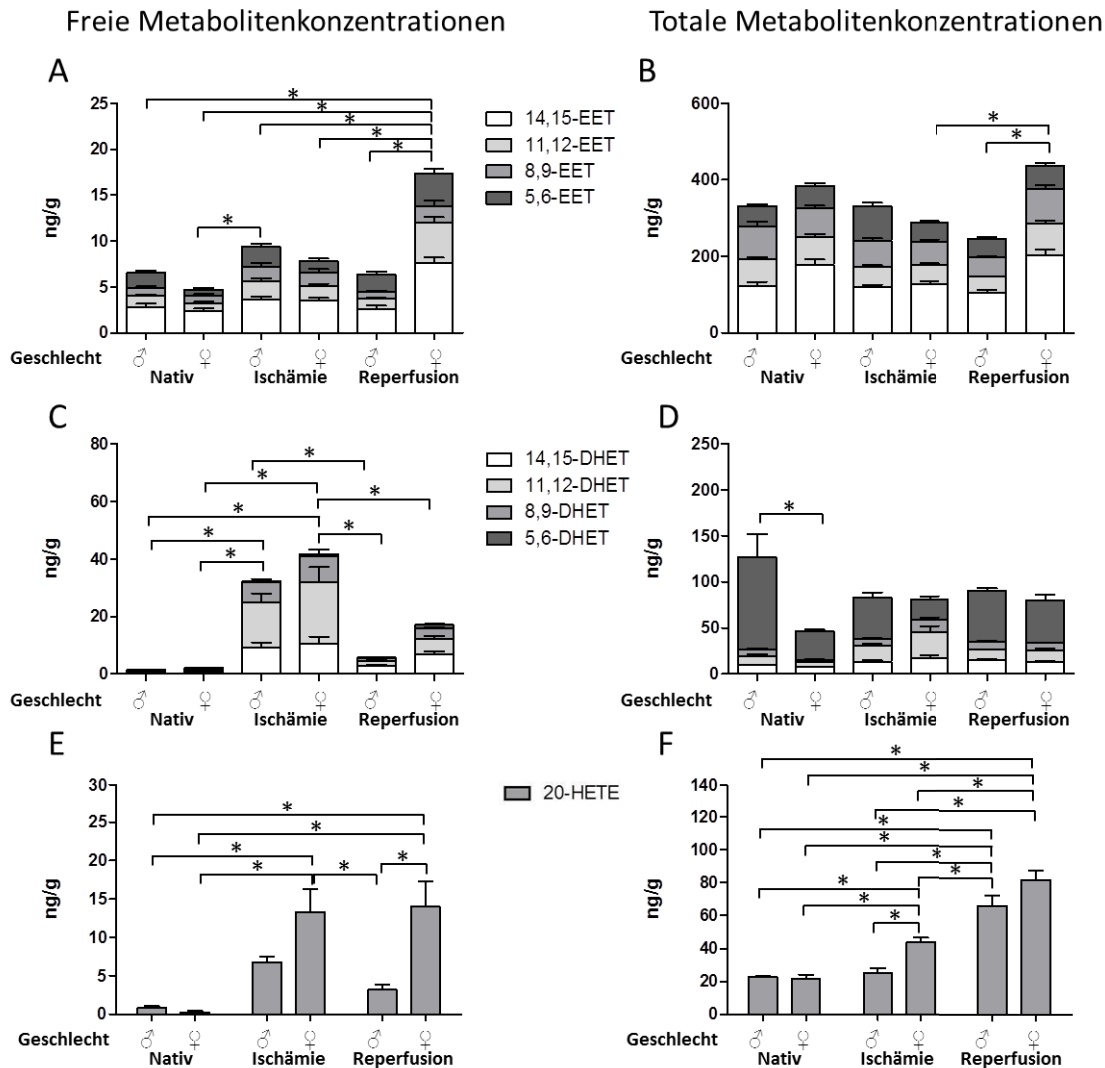
Der weitere von der Gruppe Dragun durchgeführte Readout nach Ischämie-Reperfusion (vgl. Abb. 3-1) zeigte für mit EET-Analog behandelte Gruppen im Vergleich zu Vehikel-Gruppen verringerte Kreatinin- und Urea-Werte im Serum, eine verbesserte Kreatinin-Clearance, eine geringere Schädigungen der Nierentubuli im histologischen Bild, sowie eine verbesserte Sauerstoffversorgung sowohl in Medulla als auch Cortex. Die Zahl apoptotischer Zellen war geringer, was sich auch in aktiviertem pAkt und inaktiviertem GSK3 $\beta$  widerspiegelte [112]. Dies unterstreicht die wichtige Rolle der EETs zur Eindämmung der Gewebsschäden bei ischämischem Organversagen.

Untersuchungen weiblicher Ratten hatten bereits früher ergeben, dass diese besser vor ischämischen Nierenschäden geschützt sind als Männchen [120, 121] (vgl. Abschnitt 4.1.3). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher auch weibliche Ratten in den Versuchsablauf (Abb. 3-1) eingeschlossen. Die Ergebnisse auf CYP-Eicosanoid-Ebene sind in Abb. 3-5 dargestellt. Herausragender Unterschied zu männlichen Tieren ist der Anstieg freier EETs nach zwei Stunden Reperfusion bei den Weibchen – um das 3,7fache im Vergleich zu nativen Nieren und um das 2,7fache im Vergleich zu männlichen Nieren in der Reperfusion. Das Level entspricht etwa dem der männlichen Nieren mit EET-Agonist-Behandlung (vgl. Abb. 3-4). Neben den EETs sind bei den Weibchen auch die Level freien 20-HETEs in der Reperusionsphase um das 4,3fache erhöht, im Vergleich zu männlichen Nieren nach Reperfusion.

Die Daten der Epoxide sind aufgrund der enzymatischen Hydrolase-Aktivitäten stets in Zusammenhang mit ihren Diolen zu betrachten. Sowohl bei männlichen als auch weiblichen Tieren stiegen sowohl die freien als auch totalen Diol-Level während der Ischämiephase deutlich an. Demnach werden EETs in dieser Phase zwar freigesetzt und/oder neu gebildet, jedoch rapide hydrolysiert. Auffällig ist dabei eine regioselektive Anreicherung von 11,12-DHET (Abb. 3-5 C).

In der Reperusionsphase gehen die Diole zurück, und zumindest im Rahmen des starken Anstiegs freier und totaler EETs bei den weiblichen Tieren ist eine Prävalenz für 11,12-EET erkennbar, dessen Anstieg (5,3fach bezogen auf nativ) von allen Regioisomeren am größten ist. (Abb. 3-5 A, B). Für eine erhöhte CYP-Aktivität insbesondere der Weibchen spricht auch das deutlich erhöhte Level totaler EETs nach 2 Stunden Reperfusion. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine Verschiebung des 20-HETE/EET-Verhältnisses und eine starke Diolbildung in der Ischämiephase beobachtet wurden. Ein EET-Analog verringerte den I/R-Schaden. Weibliche Ratten wiesen in der Reperusionsphase signifikant höhere EET und 20-HETE-Level auf als die Männchen.



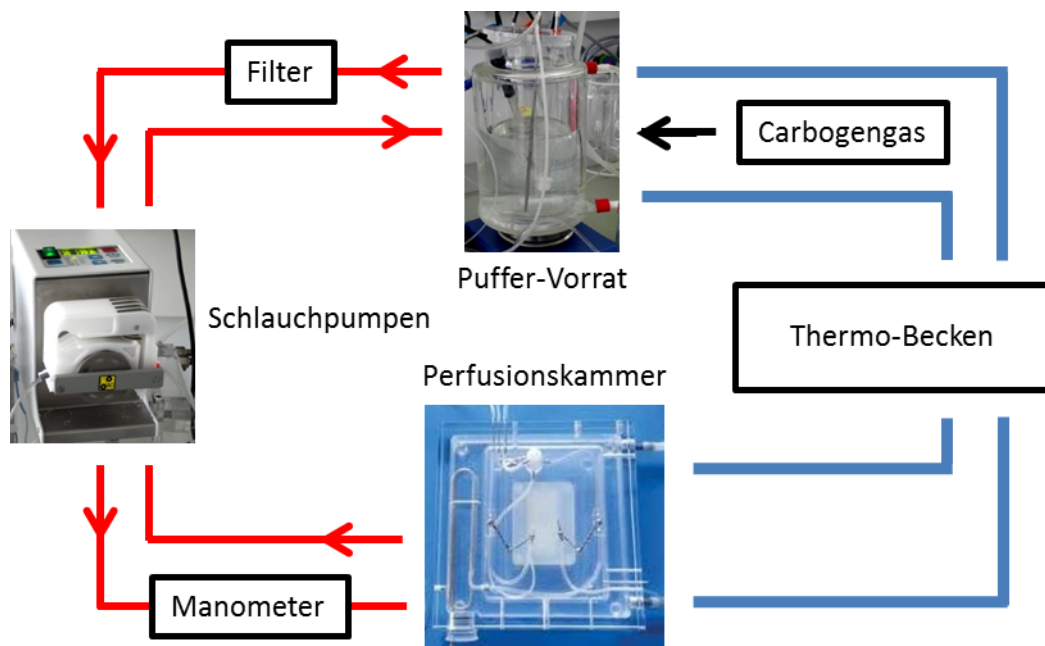


### Abbildung 3-5 Verschiebung des CYP-AA-Eicosanoidmusters nach Ischämie und Reperfusion bei männlichen und weiblichen Ratten *in vivo*

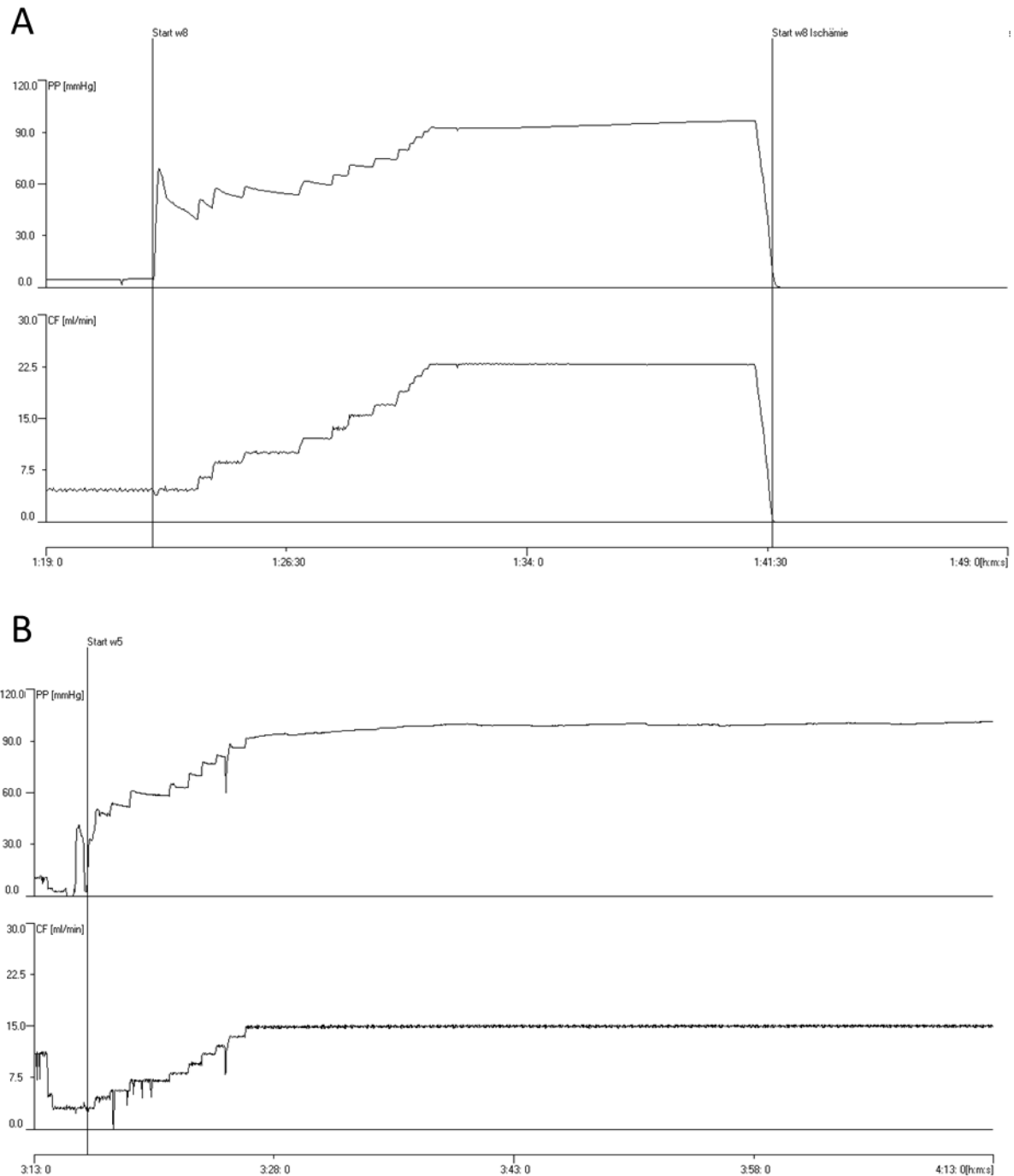
Männliche und weibliche Lewis-Ratten wurden einem Versuchsablauf entsprechend Abb.3-1 unterzogen, wobei hierbei lediglich die nativen Nieren und die Vehikelkontrollen ohne EET-Analog-Behandlung dargestellt sind. Die Nieren wurden entsprechend Abschn. 2.1.4 extrahiert und mittels achiraler LC-MS/MS analysiert. Gezeigt ist die gemessene Menge CYP-AA-Eicosanoid pro Feuchtmasse, A) freie EETs B) totale EETs, C) freie DHETs, D) totale DHETs, E) freies 20-HETE, F) totales 20-HETE. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=6-8). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (One-Way-ANOVA, Bonferroni-Post-Test).

### **3.1.2 Akutes Nierenversagen: Modellversuche ex vivo**

Eine bei der Omeicos GmbH Berlin vorhandene Langendorff-Apparatur zur Perfusion von Herzen wurde als Basis für den Aufbau des IPK-Systems für Rattenniere genutzt. Abbildung 3-6 zeigt den schematischen Aufbau der Anlage. Die Niere wurde in einer Perfusionskammer platziert, deren Temperatur auf 37°C gehalten wurde. Über die kanülierte Arteria renalis strömte der Perfusionspuffer ein, der neben Basisbestandteilen auch Glucose und 8 Aminosäuren, sowie Mannitol als Diuretikum enthielt. Die Viskosität des Blutes wurde durch ein Gemisch aus Dextran und BSA modelliert. Ureter und Nierenvene wurden nicht kanüliert, um den Zeitbedarf der Präparation zu minimieren und dadurch eintretende Nierenschädigung zu vermeiden. Die Niere wurde stattdessen auf einem Drahtgeflecht mit darunterliegendem Sammeltrichter platziert, sodass Effluat frei ablaufen und anschließend abgepumpt werden konnte. Die Flussrate des Puffers wurde an der Schlauchpumpe manuell reguliert. Weitere Einzelheiten vgl. Kapitel 2.3.1.2.



**Abbildung 3-6 Schematischer Apparatur-Aufbau für die isolierte perfundierte Niere**

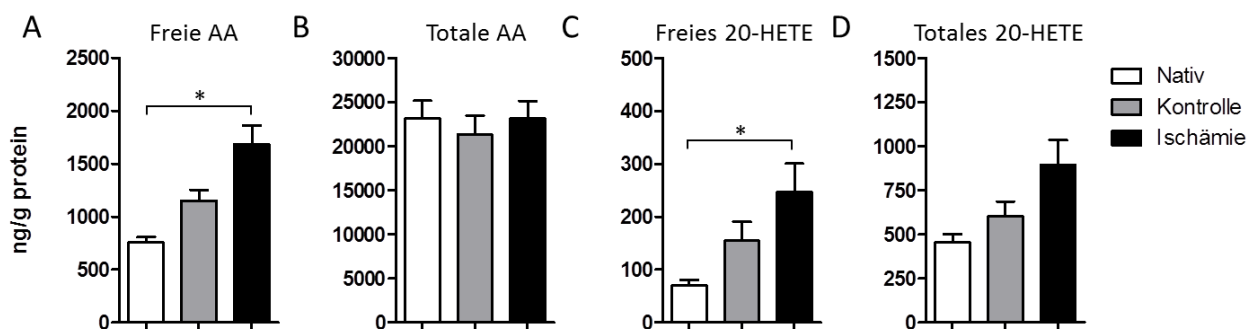


### Abbildung 3-7 Perfusionsdruck und Flussrate der IPK

Verlauf von Perfusionsdruck in mm Hg (oberes Diagramm) und Flussrate in ml/min (unteres Diagramm) während der Nierenperfusion. Der „Start“-Marker bezeichnet den Zeitpunkt des Anschlusses der isolierten Niere an das Perfusionssystem. Die X-Achse bezeichnet den Zeitverlauf in h:min:sek. **A)** Equilibrierung und anschließend durch Stopp des Flusses induzierte Ischämie über 40 min. **B)** 60 min lang perfundierte Kontrollniere mit stabilen Parametern. Die Autoregulation unterhalb von 90 mm Hg ist jeweils durch Absinken des Perfusionsdrucks bei gleichbleibender Flussrate erkennbar.

Die kanülierte Niere wurde bei einer Puffer-Flussrate von 5 ml/min an das Perfusionssystem angeschlossen. Im Verlauf von 20 min wurde die Flussrate schrittweise erhöht, bis ein Druck von 90 mm Hg erreicht wurde. Abbildung 3-7 zeigt den Verlauf beider Parameter. Erkennbar ist dabei die Druckkompensation der Niere, solange 90 mm Hg noch nicht erreicht waren (Autoregulation der Niere). Oberhalb von 90 mm Hg wurde eine Flussrate von 15-30 ml/min erreicht, im weiteren Verlauf der Perfusion blieben Druck und Flussrate stabil. Im Anschluss an die 20-minütige Equilibrierungsphase wurde eine 40-minütige Ischämie durch Unterbrechung der Perfusion, oder zur Kontrolle eine Perfusion über weitere 40 Minuten durchgeführt.

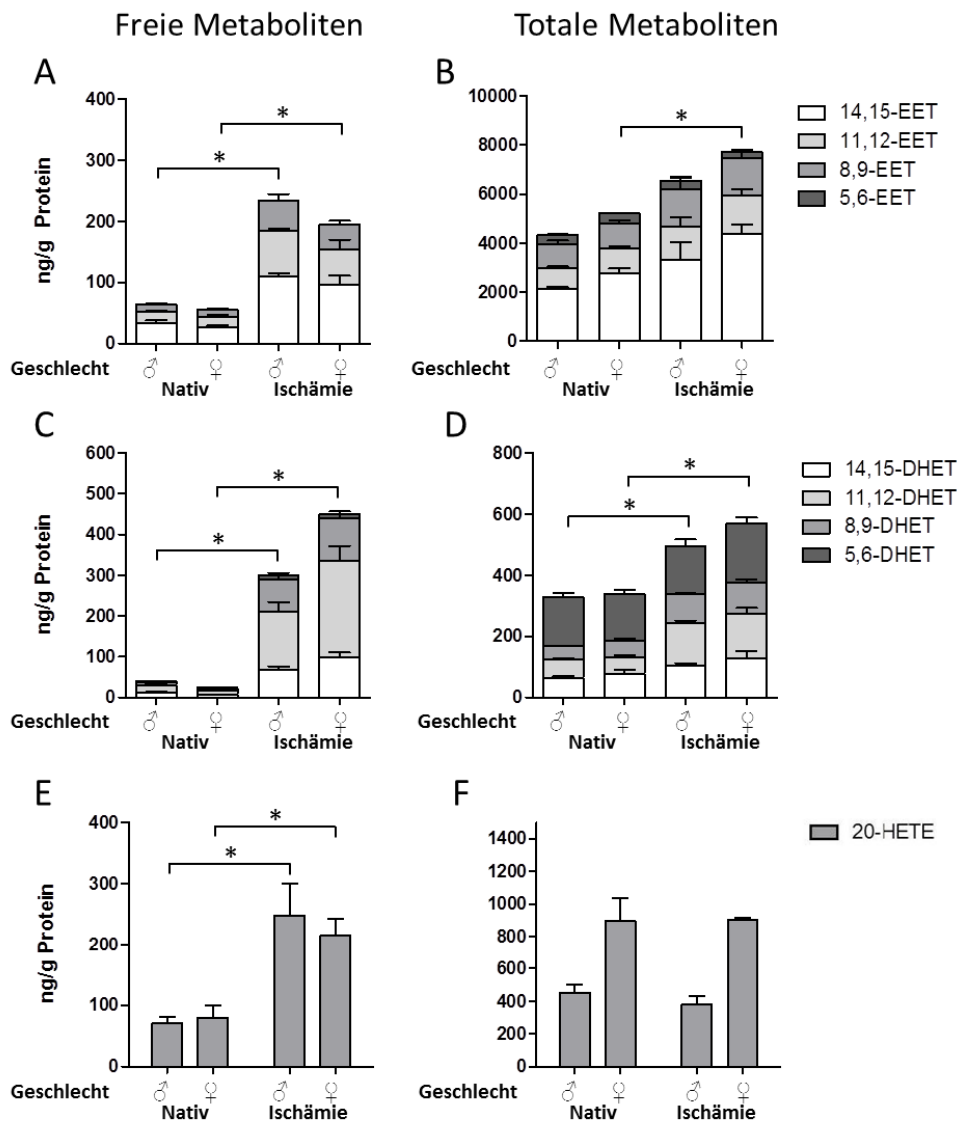
Die oben genannten Parameter wurden als Qualitätskriterien einer erfolgreichen Nierenpräparation und physiologischen Nierenperfusion herangezogen. Die vollständige Entfärbung der Niere unmittelbar nach Beginn der Perfusion, stellte ein weiteres Qualitätskriterium dar. Nach Beendigung der Perfusion, wurde zudem anhand freier und totaler AA- und 20-HETE – Level im Organextrakt extrapoliert, ob bereits pathophysiologische Signalwege aktiviert waren oder nicht. Abbildung 3-8 zeigt, dass die Nieren männlicher Ratten nach 60 min Perfusion bereits tendenziell erhöhte Parameter aufwiesen. Gleichzeitig ist jedoch erkennbar, dass die Level in der Ischämiegruppe nochmals deutlich erhöht und nur diese signifikant verschieden zu den Leveln der nativen Nieren waren (bei freier AA 2,2fach erhöht, bei freiem 20-HETE 3,5fach erhöht). Das etablierte Modell der IPK ermöglichte demnach zwar keine absolut physiologische Präparation und Perfusion über 60 min. Der durch Ischämie induzierte Nierenschaden war jedoch noch als spezifisches Schadensbild erkennbar, sodass sich die etablierte Methodik als ausreichend stabil und somit geeignet für Interventionsstudien einschätzen lässt.



### Abbildung 3-8 IPK als stabiles Modell zur Untersuchung von Ischämie

Dargestellt sind Nieren männlicher Wistar-Ratten, die direkt entnommen und analysiert wurden („Nativ“), der Präparation und Kanülierung der Nierenarterie sowie einer 60-minütigen Perfusion unterzogen wurden („Kontrolle“), sowie Nieren, bei denen nach 20 minütiger Perfusion eine 40-minütige Ischämie induziert wurde („Ischämie“). Eine signifikante Freisetzung von AA trat nach Ischämie verglichen mit Nativ ein (A), die sehr großen totalen AA-Level veränderten sich nicht (B). Die Level freien 20-HETEs (C) erhöhten sich verglichen mit nativ erst durch die Ischämie signifikant. Auch die Level totalen 20-HETEs waren nach Ischämie tendenziell erhöht, jedoch nicht signifikant (D). In der Perfusionskontrolle trat keine signifikante Freisetzung von AA oder 20-HETE ein. Die Proben wurden entsprechend Abschn. 2.1.4 extrahiert und mittels achiraler LC-MS/MS analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=5). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test, Dunns-Post-Test).

Eine weitere Fragestellung war, inwiefern sich die Veränderung der Eicosanoidmuster *in vivo* (vgl. Kap. 3.1.1) mittels IPK reproduzieren lässt. Analog zu Abbildung 3-5, sind in Abbildung 3-9 entsprechende Ergebnisse aus IPK-Versuchen dargestellt. Da sich die Niere während der Perfusion trotz vorhandener Nierenkapsel erheblich vergrößerte und folglich die Feuchtmasse nicht konstant war, wurden die Daten bei der IPK auf Protein statt auf Feuchtmasse bezogen berechnet.



**Abbildung 3-9 Einfluss der Ischämie auf die Bildung von CYP-Eicosanoiden im IPK-Modell mit isolierten Nieren aus weiblichen und männlichen Ratten**

Dargestellt sind Nieren männlicher und weiblicher Wistar-Ratten, die direkt entnommen und analysiert wurden („Nativ“), sowie Nieren, bei denen nach 20 minütiger Perfusion eine 40-minütige Ischämie induziert wurde („Ischämie“). Die Nieren wurden entsprechend Abschn. 2.1.4 extrahiert und mittels achiraler LC-MS/MS analysiert. Gezeigt ist die gemessene Menge CYP-AA-Eicosanoid bezogen auf Protein, A) freie EETs B) totale EETs, C) freie DHETs, D) totale DHETs, E) freies 20-HETE, F) totales 20-HETE. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=5). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-Test).

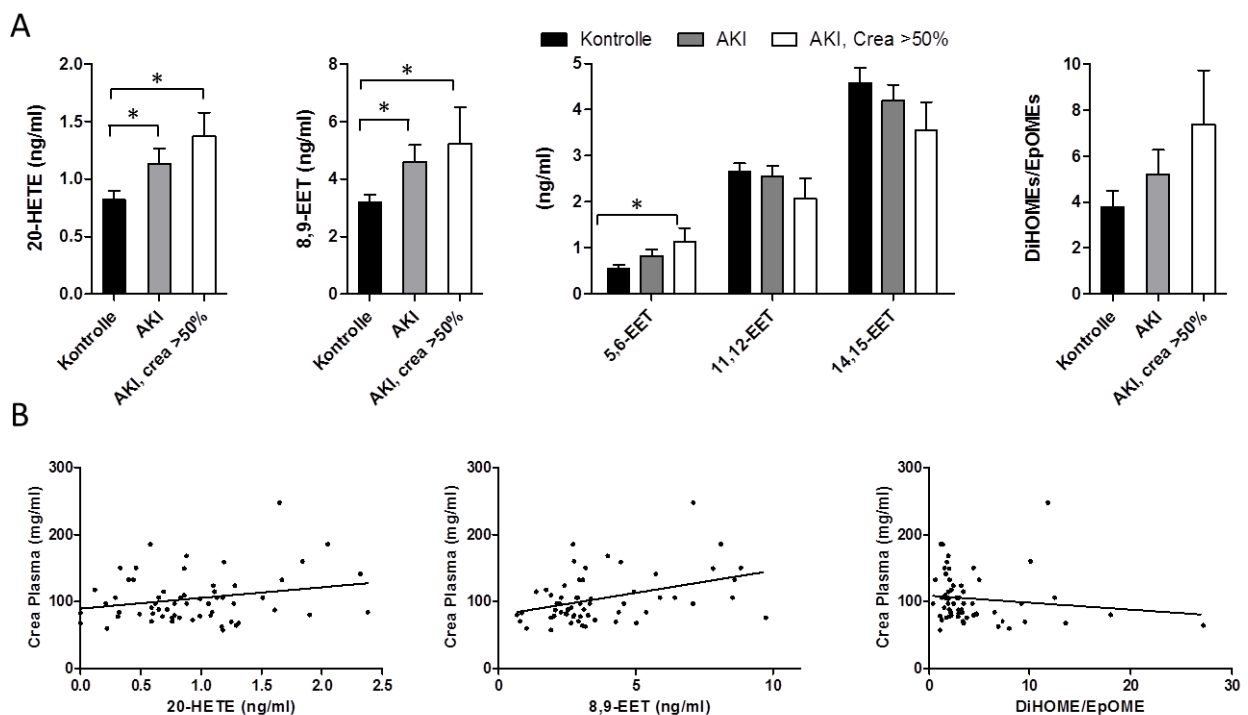
Analog zu den *in vivo*-Versuchen, bewirkte die Ischämie im IPK-Modell männlicher Rattennieren einen signifikanten Anstieg von freiem 20-HETE und DHETs, wobei auch der Anstieg freier EETs signifikant war. Er war bei freiem 11,12-EET (3,5-4fach) und 11,12-DHET (12-13fach) am stärksten ausgeprägt, was zusammengenommen mit den auch hier ansteigenden totalen Levels dieser Metaboliten auf eine gesteigerte CYP-AA-Aktivität unter Beteiligung von CYP2C23 bereits in der Ischämiephase hindeutet. Dagegen fiel der Anstieg von 20-HETE weniger intensiv aus als im *in vivo*-Modell. Eine Geschlechtsspezifität war im Rahmen der Ischämiephase erneut nicht deutlich erkennbar, jedoch trat in weiblichen Nieren ein stärkerer, signifikanter Anstieg der totalen EETs ein – ein Befund, der in den *in vivo*-Versuchen nach zwei Stunden Reperfusion beobachtet wurde. Das Verhältnis von freiem 20-HETE zu freien EETs blieb bei Männchen ischämiebedingt unverändert bei 1,1:1 und änderte sich bei den Weibchen geringfügig von 1,5:1 nativ auf 1,1:1 nach Ischämie.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine Perfusion der Rattenniere *ex vivo* unter stabilen Bedingungen im Sinne nicht signifikanter 20-HETE-Freisetzung über 60 min bei stabilem Perfusionsdruck und -Fluss erreicht wurde. Zudem konnte in einem Ischämie-Modell die Freisetzung von AA, sowie der EETs, DHETs und 20-HETE beobachtet werden. Damit eignet sich die IPK grundsätzlich für mögliche Interventionsstudien, wobei 20-HETE als Biomarker für die frühzeitige Aktivierung pathophysiologischer Kaskaden dient. Bei der unmittelbaren Übertragung von *in vivo*-Versuchen in das IPK-Modell, traten viele klare Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede im CYP-Eicosanoidprofil auf. Zwar reproduzierte sich der ischämiebedingte Anstieg von 20-HETE sowie EETs und DHETs (insbesondere des 11,12-Regioisomers), nicht jedoch die Verschiebung des Verhältnisses von 20-HETE zu EETs zuungunsten der EETs in der Ischämiephase.

### **3.1.3 CYP-Eicosanoide in humanem Plasma bei akutem Organversagen**

Um eine prediktive Rolle der CYP-Eicosanoide direkt im menschlichen Organismus unter den Verhältnissen zu untersuchen, wie sie bei Patienten des akuten Nierenversagens und Vorhofflimmerns vorliegen, wurden Plasmaproben einer klinischen Studie [122] analysiert. Dabei handelte es sich um jene Proben ohne Bicarbonat-Behandlung aus der Studie des Deutschen Herzzentrums. Akutes Nierenversagen wie auch Vorhofflimmern treten gehäuft als Folgeerscheinungen bestimmter Herzoperationen auf. Alle hier betrachteten Patienten mussten erkrankungsbedingt einer offenen Herz-OP unter Verwendung des kardiopulmonalen Bypasses unterzogen werden. Die Gruppeneinteilung erfolgte zunächst nach gleichenteils männlichen und weiblichen Patienten passenden Alters mit postoperativem akutem Nierenversagen (AKI-Gruppe; n=21) und solchen, die postoperativ kein AKI entwickelten (AKI-Kontrollgruppe, n=39). AKI bezeichnete dabei Patienten, deren Serum-Kreatininlevel sich zu einem beliebigen Zeitpunkt innerhalb von fünf Tagen nach Operation um mehr als 25% oder auf mehr als 0,5 mg/dl (44 µM) erhöhte. In beiden Gruppen waren dabei gleichermaßen auch einige Patienten mit Vorhofflimmern repräsentiert. Einzelheiten zum Hintergrund der

ausgewählten Patienten und der Studie sind der dazugehörigen Publikation zu entnehmen [112]. Wie aus Abb. 3-10 hervorgeht, waren die totalen 20-HETE-Level in der AKI-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $1.14 \pm 0.13$  vs.  $0.82 \pm 0.08$  ng/ml;  $p=0.028$ ). Signifikant erhöhte Level zeigten sich außerdem auch in Bezug auf 8,9-EET ( $4.60 \pm 0.45$  vs.  $3.19$  ng/ml;  $p=0.015$ ). Andere EETs waren in dieser Betrachtung nicht signifikant verschieden. Veränderungen der sEH-Aktivität anhand des DiHOMEs/EpOMEs-Verhältnisses waren beim Vergleich der genannten Gruppen nicht klar erkennbar. Beschränkte man die AKI-Gruppe auf Fälle ( $n=7$ ), bei denen die Kreatinin-Level um mindestens 50% anstiegen, traten die Befunde deutlicher hervor, wobei in dem Fall auch signifikant höhere 5,6-EET-Level festzustellen waren (Abb. 3-10). Eine Korrelation der präoperativen Metabolitlevel mit den Plasma-Kreatininwerten 24 Stunden nach Herz-Operation reproduzierte im Wesentlichen die Befunde der Gruppeneinteilung: Die sEH-Aktivität wies keine Korrelation auf. Die Level von 8,9-EET korrelierten deutlich (Pearson-Koeffizient 0,4) und von 20-HETE schwach (Pearson-Koeffizient 0,24) mit Kreatinin (Abbildung 3-10).

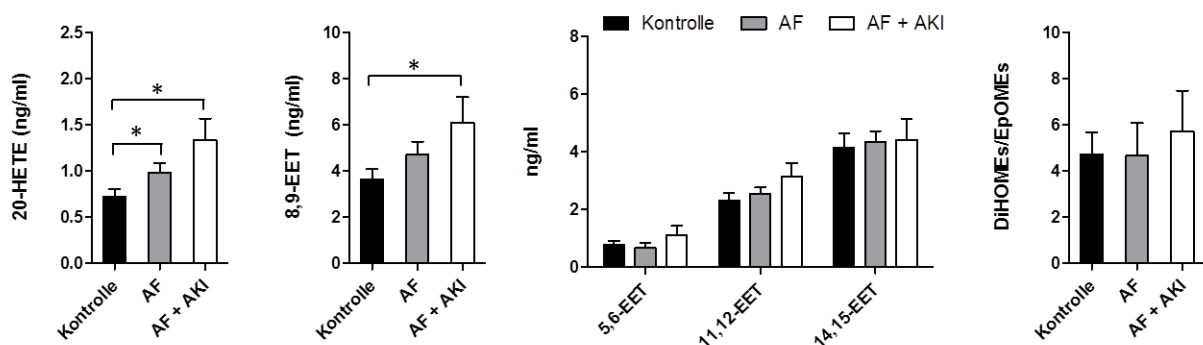


**Abbildung 3-10 CYP-Eicoanoide als mögliche prädiktive Biomarker für das Auftreten von postoperativer AKI**

Dargestellt sind totale Metaboliten aus humanem Plasma von Patienten nach offener Herzoperation, die daraufhin keine AKI entwickelten (Kontrolle,  $n=39$ ), AKI aufwiesen (AKI,  $n=21$ ) und teilweise dabei einen Anstieg von Serumkreatinin um mehr als 50% zeigten (AKI,  $\text{crea} >50\%$ ,  $n=7$ ). Die Präparation erfolgte mittels alkalischer Hydrolyse und SPE (vgl. Abschn. 2.1.4), darauf folgte die Analyse mittels achiraler LC-MS/MS. **A)** Absolute Messwerte der EETs und 20-HETE, sowie der sEH-Aktivität in Gestalt des Quotienten aus Absolutwerten der DiHOMEs und EpOMEs. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt ( $n=7-39$ ). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (t-Test). **B)** Auftragung präoperativer 20-HETE, 8,9-EET und der sEH-Aktivität gegen Kreatinin im Plasma 24 Stunden nach Herzoperation. Die lineare Regression ist eingetragen. Der Pearson-Koeffizient beträgt 0,24 ( $p = 0,074$ ) für 20-HETE, 0,4 ( $p = 0,002$ ) für 8,9-EET und -0,13 ( $p = 0,315$ ) für DiHOMEs/EpOMEs.

In einer weiteren Betrachtung mit Fokus auf Vorhofflimmern (AF) wurden Patienten derselben Auswahl so gruppiert, dass die Kontrollgruppe Personen beinhaltete, die weder AF noch AKI im Beobachtungszeitraum aufwies (n=21). Der Vergleich erfolgte mit einer Gruppe, bei der ebenfalls keine AKI, jedoch AF postoperativ auftrat (n=14), sowie einer Gruppe, die sowohl AF als auch AKI postoperativ entwickelte (n=7). Die basalen 20-HETE-Level waren beim Auftreten von AF ohne AKI signifikant größer (1,4fach) und lagen bei zusätzlichem Auftreten von AKI nochmals höher (2,0fach). Für 8,9-EET traf ein ähnlicher Befund zu mit 1,3fach und 1,7fach höheren Level. Andere EETs waren nicht erhöht. Auch die sEH-Aktivität war in diesen Gruppen nicht signifikant verschieden (Abbildung 3-11).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass erhöhte Level von 20-HETE und 8,9-EET offensichtlich mit einem erhöhten Risiko, nach einer kardiopulmonalen Bypass-Operation an akutem Nierenversagen oder Vorhofflimmern zu erkranken, assoziiert sind.



**Abbildung 3-11 CYP-Eicoanoide als mögliche prädiktive Biomarker für das Auftreten von postoperativem Vorhofflimmern**

Dargestellt sind totale Metaboliten aus humanem Plasma von Patienten nach offener Herzoperation, die daraufhin weder Vorhofflimmern (AF) noch AKI entwickelten (Kontrolle, n=21) oder zwar kein AKI aber AF auftrat (AF, n=14) oder sowohl AKI und AF auftraten (AF+AKI, n=7). Die Präparation erfolgte mittels alkalischer Hydrolyse und SPE (vgl. Abschn. 2.1.4), darauf folgte die Analyse mittels achiraler LC-MS/MS. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=7-39). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (t-Test).

### **3.1.4 Sekundärmetabolismus von CYP-Eicosanoiden bei akutem Organversagen**

Für die aus PUFAs gebildeten CYP-Eicosanoide sind verschiedene Wege des Sekundärmetabolismus bekannt, die bei der Interpretation gemessener Metabolit-Level in biologischen und klinischen Proben Berücksichtigung finden sollten. Im vorliegenden Kapitel wurde einerseits der hydrolytische Abbau der Epoxide durch sEH zu Diolen im Zusammenhang mit auftretendem Organschaden beleuchtet, sowie der alternative Sekundärmetabolismus durch CYPs zu HEETs analysiert.

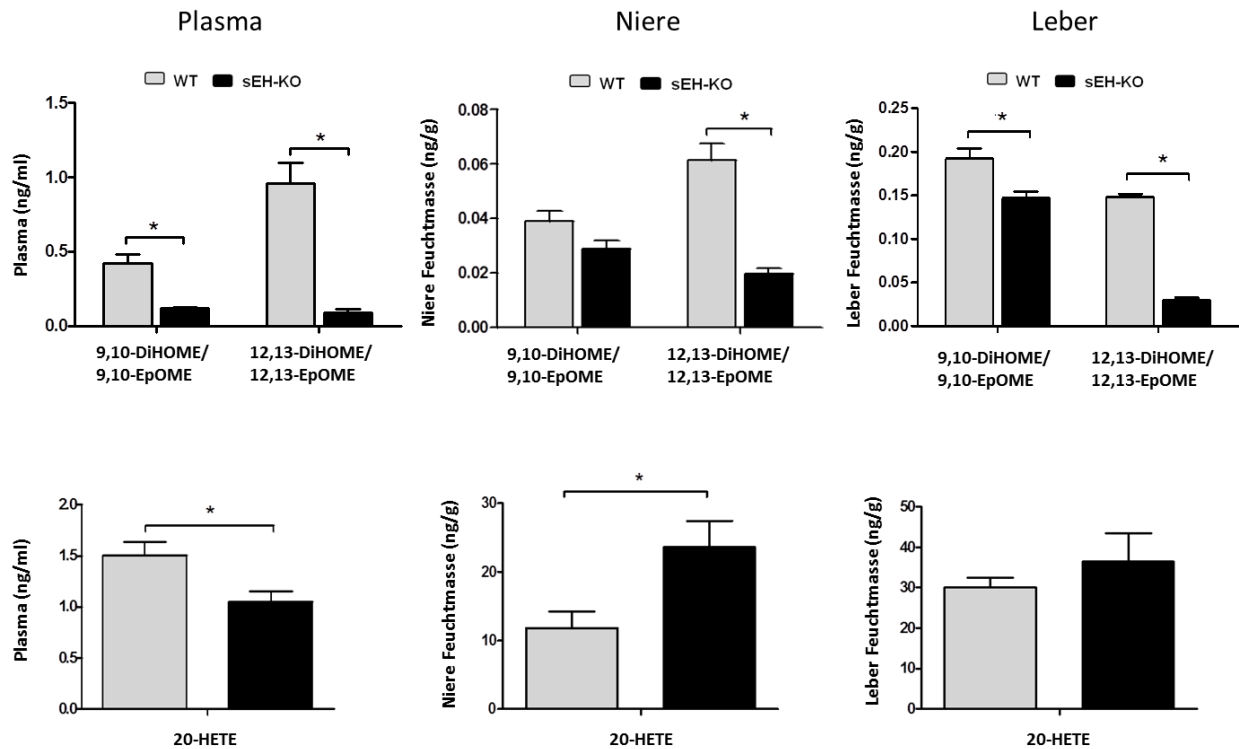


### 3.1.4.1 Inaktivierung von Monoepoxiden durch sEH

Die lösliche Epoxid-Hydrolase (sEH) spaltet Epoxide wie die EETs hydrolytisch zu biologisch weitgehend inaktiven Diolen, in dem Fall DHETs. Von einem sEH-knockout sind demnach einerseits ein Anstieg des endogenen EET/DHET-Verhältnisses, sowie andererseits eine Verringerung des ischämischen Organschadens zu erwarten. Um dies zu testen, wurden in Kooperation mit Dr. Ye Zhu Wildtyp- und sEH-Doppelknockout-Mäuse einerseits in ihrem basalen Eicosanoidprofil untersucht und andererseits einer 22 minütigen renalen Ischämie und zwei Tagen Reperfusion unterzogen. Danach wurde der Organschaden anhand mehrerer pathophysiologischer Parameter bestimmt. Details zum Versuchsablauf sind der dazugehörigen Veröffentlichung [123] zu entnehmen.

Primär war infolge der ausgeschalteten sEH-Wirkung eine Unterdrückung der Diolbildung aus Monoepoxiden zu erwarten. Aufgrund der großen Substrataffinität der sEH zu EpOMes wird die endogene biologische Aktivität dieser Hydrolase üblicherweise anhand des Verhältnisses aus DiHOMes zu EpOMes bestimmt. Abbildung 3-12 illustriert, dass zwar eine signifikante Verkleinerung dieses Verhältnisses eintrat – jedoch lediglich eine Verschiebung und keine vollständige Unterdrückung der Diolbildung vorlag. In Bezug auf DHETs und EETs war der Effekt des sEH-Knockouts noch geringfügiger - lediglich die Level von 14,15-DHET waren in Knockout-Tieren signifikant niedriger und von 14,15-EET signifikant erhöht (Tabelle 3-1). Dagegen wiesen sEH-Aktivitätsmessungen mit cytosolischen Fraktionen und Western-Blot-Analysen aus Nieren- und Lebergewebe jeweils eindeutig auf einen totalen Verlust der sEH-Aktivität bzw. -Expression in den Knockout-Tieren hin [123]. Zusammengenommen beschreiben diese Befunde eine tatsächlich totale Ausschaltung der sEH-Expression im verwendeten Modell. Sie legen gleichzeitig nahe, dass die biologische Inaktivierung von Monoepoxy-Eicosanoiden durch Hydrolyse nur zum Teil durch sEH getriggert, und das Verhältnis aus DiHOMes und EpOMes nur bedingt zur Beschreibung der Hydrolase-Aktivität allgemein geeignet ist.

Wie in der gemeinsamen Publikation mit Ye Zhu dargestellt [123], zeigte sich nach erfolgter Ischämie-Reperfusion an der Niere im histologischen Bild ein vergrößerter Nekrose- wie auch Apoptoseschaden der renalen Tubuli in den Knockout-Tieren, sowie ein erhöhter Inflammationsstatus. Hinzu kamen signifikant höhere Serumkreatinin- und Ureawerte in den Knockout-Tieren. Der größere Nierenschaden durch den sEH-Knockout steht somit der eingangs formulierten These entgegen. Tabelle 3-1 zeigt auf, dass 20-HETE, biologisch oft als EET-Antagonist wirksam, anderes als andere Monohydroxy-Eicosanoide ein signifikant erhöhtes Level in den Nieren der Knockout-Tiere aufwies. Da EETs in den Nieren dieser Tiere kaum erhöht waren, lag eine deutliche Verschiebung der 20-HETE-EET-Balance vor. Die positive Wirkung der sEH-Inaktivierung wurde somit durch signifikant größere 20-HETE-Level biologisch maskiert, woraus der größere Nierenschaden der Knockout-Tiere resultierte. Der metabolische Befund wurde durch eine festgestellte Überexpression von 20-HETE bildendem CYP4a12a in den Nieren der Knockout-Tiere gestützt [123].



### Abbildung 3-12 Beeinflussung der Hydrolase-Aktivität durch sEH-Knockout

Dargestellt sind totale Metaboliten des Plasmas, der Niere und der Leber von Wildtypen und Mäusen mit globalem sEH-Doppelknockout. Die Präparation erfolgte mittels alkalischer Hydrolyse und SPE (vgl. Abschn. 2.1.4), darauf folgte die Analyse mittels achiraler LC-MS/MS. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=5-7). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test).

Zusammengefasst ist festzuhalten, dass ein globaler sEH-Knockout zwar in signifikantem Ausmaß das Verhältnis der Epoxide zu Diolen verschob, sich diese Veränderung jedoch im Rahmen der Pathophysiologie des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens nicht in der Form auswirkte wie erwartet. Die Inaktivierung der Monoepoxy-Eicosanoide durch sEH ist demnach zwar ein entscheidender Faktor für die Verfügbarkeit von Monoepoxiden, jedoch keineswegs alleinig ausschlaggebend zur protektiven Entfaltung deren Wirkung.

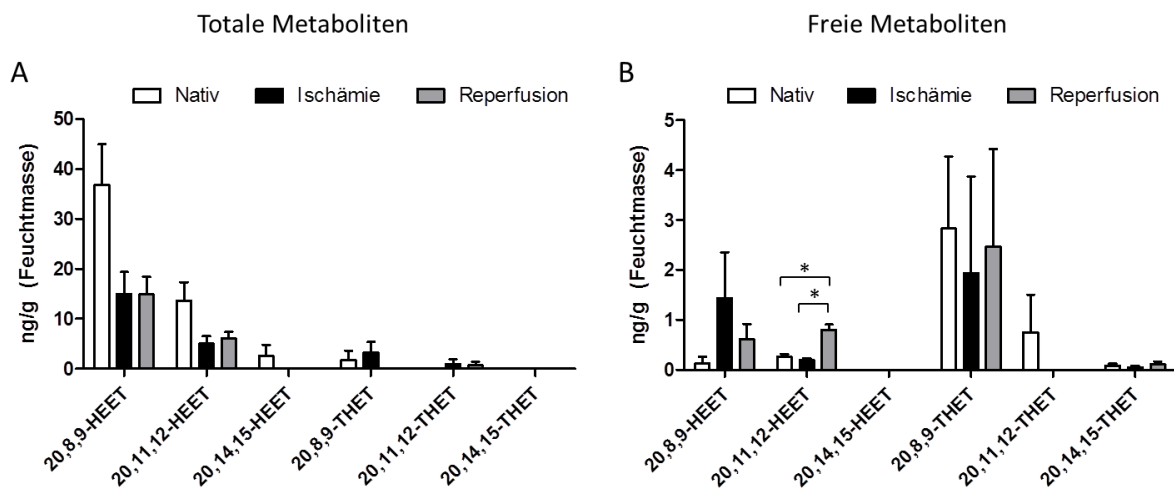
**Tabelle 3-1 Auswirkungen des sEH-Knockouts auf das Eicosanoidprofil in Mäusen**

	Niere		Leber		Plasma	
	WT	sEH-KO	WT	sEH-KO	WT	sEH-KO
<b>Monoepoxide</b>						
12,13-EpOME	247.1±25.14	525.4±58.59*	343.5±19.72	1742±198.4*	31.39±8.12	131.6±16.94*
9,10-EpOME	214.2±25.64	300.9±26.37*	144.7±8.38	259.0±26.64*	20.57±4.82	40.30±7.32
14,15-EET	345.4± 38.27	361.8±17.25	231.3± 17.82	428.2±24.36*	4.00± 0.55	9.39±0.29*
11,12-EET	152.3±18.82	154.1±10.81	41.83±4.77	53.60±6.08	1.35±0.21	1.73±0.18
8,9-EET	134.7±14.36	127.6±9.26	21.81±5.59	28.92±6.78	1.97±0.25	3.43±0.17*
5,6-EET	141.3±33.19	123.6±11.62	8.19±1.41	17.82±3.24*	0.21±0.13	0.20±0.07
<b>Diole</b>						
12,13-DiHOME	14.87±1.55	10.08±1.09*	50.53±3.21	52.96±4.66	31.63±9.60	12.59±4.10
9,10-DiHOME	8.24±1.05	8.57±1.03	27.54±1.66	37.65±4.07	8.99±2.59	4.71±1.01
14,15-DHET	11.49±0.87	8.20±1.01*	19.68±1.72	8.91±0.75*	0.68±0.07	0.47±0.07
11,12-DHET	4.76±0.38	4.74±0.61	19.79±1.39	18.19±1.47	0.54±0.04	0.42±0.04
8,9-DHET	7.01±0.73	6.30±0.73	46.20±2.37	40.52±2.66	1.35±0.11	1.19±0.09
5,6-DHET	44.90±3.30	46.17±5.48	45.99±5.30	56.24±3.16	3.34±0.34	4.42±0.32*
<b>ω/( ω1)-Hydroxylase Metaboliten</b>						
20-HETE	11.83±2.38	23.59±3.85*	30.09±2.42	36.57±6.85	1.50±0.13	1.05±0.11*
19-HETE	32.79±6.58	33.71±6.88	37.70±6.21	43.96±6.63	8.49±2.24	8.50±1.45
<b>Sonstige Hydroxylase Metaboliten</b>						
15-HETE	812.5±106.9	709.1±72.32	706.3±97.56	630.7±87.48	28.64±3.85	31.12±3.03
12-HETE	124.3±13.52	116.2±6.97	121.0±10.76	104.8±9.46	19.14±6.70	16.75±1.92
11-HETE	187.7±22.09	181.4±22.15	178.1±25.03	153.8±13.59	7.92±1.08	10.07±0.94
9-HETE	173.6±22.28	187.3±11.36	124.9±11.47	114.1±6.20	7.25±0.82	9.53±1.05
8-HETE	114.7±14.47	102.8±7.21	141.3±13.15	123.1±6.97	8.06±0.95	10.18±1.26
5-HETE	289.7±50.61	249.8±17.70	360.9±35.28	291.0±15.94	22.68±2.12	27.93±2.42

Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM gezeigt (n=5-7). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* = p<0,05 (Mann-Withney-U-Test).

### 3.1.4.2 Bildung von 20-HEETs als Sekundärmetaboliten der HETEs und EETs bei ischämischem Organschaden

Die Bildung der biologisch aktiven 20-HEETs kann - ausgehend von AA - über zwei Wege mit verschiedenen Intermediaten erfolgen. Zum einen ist die Bildung von 20-HETE aus AA und folgende Epoxidation möglich. Umgekehrt können 20-HEETs auch aus EETs und anschließende Hydroxylierung gebildet werden (Abbildung 1-5). Im Rahmen der Diplomarbeit des Autors wurden Messbedingungen der LC-MS/MS für 20-HEETs und -THETs etabliert [24]. Die erneute Synthese entsprechender Standardsubstanzen ermöglichte im Rahmen der vorliegenden Arbeit, diese Sekundärmetaboliten in die Analytik von Proben des ischämischen Organschadens einzubeziehen. Die Bestimmung der endogenen Vorkommen sollte eine verbesserte Interpretation gemessener 20-HETE- und EET-Level ermöglichen.



**Abbildung 3-13 20-HEETs und 20-THETs bei renaler I/R an männlichen Ratten**

Dargestellt sind totale (A) und freie (B) Metaboliten aus Nierengewebe männlicher Lewis-Ratten im Versuchsrahmen einer *in vivo*-I/R entsprechend Abbildung 3-4. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=6-8). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (One-Way-ANOVA, Bonferroni-Post-Test).

Nieren von Ratten, die einem I/R-Modell *in vivo* unterzogen wurden (vgl. Abschn. 3.1.1), wiesen signifikant höhere Level freien 20,11,12-HEETs in der Reperfusion auf (Abbildung 3-13B). 20,11,12-HEET ist lediglich ein Nebenprodukt der renalen Ratten-Monoperoxigenase CYP2C23, was für 11,12-EET als Precursor und die Katalyse durch eine CYP-Monohydroxylase spricht. Auch freies 20,8,9-HEET, das von CYP2C23 als Hauptprodukt aus 20-HETE gebildet wird, erhöhte sich während Ischämie und Reperfusion deutlich. Der Befund war infolge recht großer Streuung bzw. geringen Anzahl der Messwerte jedoch nicht signifikant. Eine ausgeprägte Streuung der Einzelwerte war auch bei den THETs zu beobachten, was auf einen individuell sehr unterschiedlichen Sekundärmetabolismus hindeutet. Keine signifikanten Unterschiede waren bei den totalen Metaboliten

(Abbildung 3-13A) festzustellen, wobei tendenziell höhere Level in den nativen Nieren vorlagen. Tabelle 3-2 veranschaulicht anhand eines Vergleichs der Absolutlevel von 20-HETE und der Summe aus EETs und DHETs mit der Summe aus 20-HEETs und 20-THETs, dass der Sekundärmetabolismus durch CYPs zu 20-HEETs endogen eine erhebliche Rolle spielt.

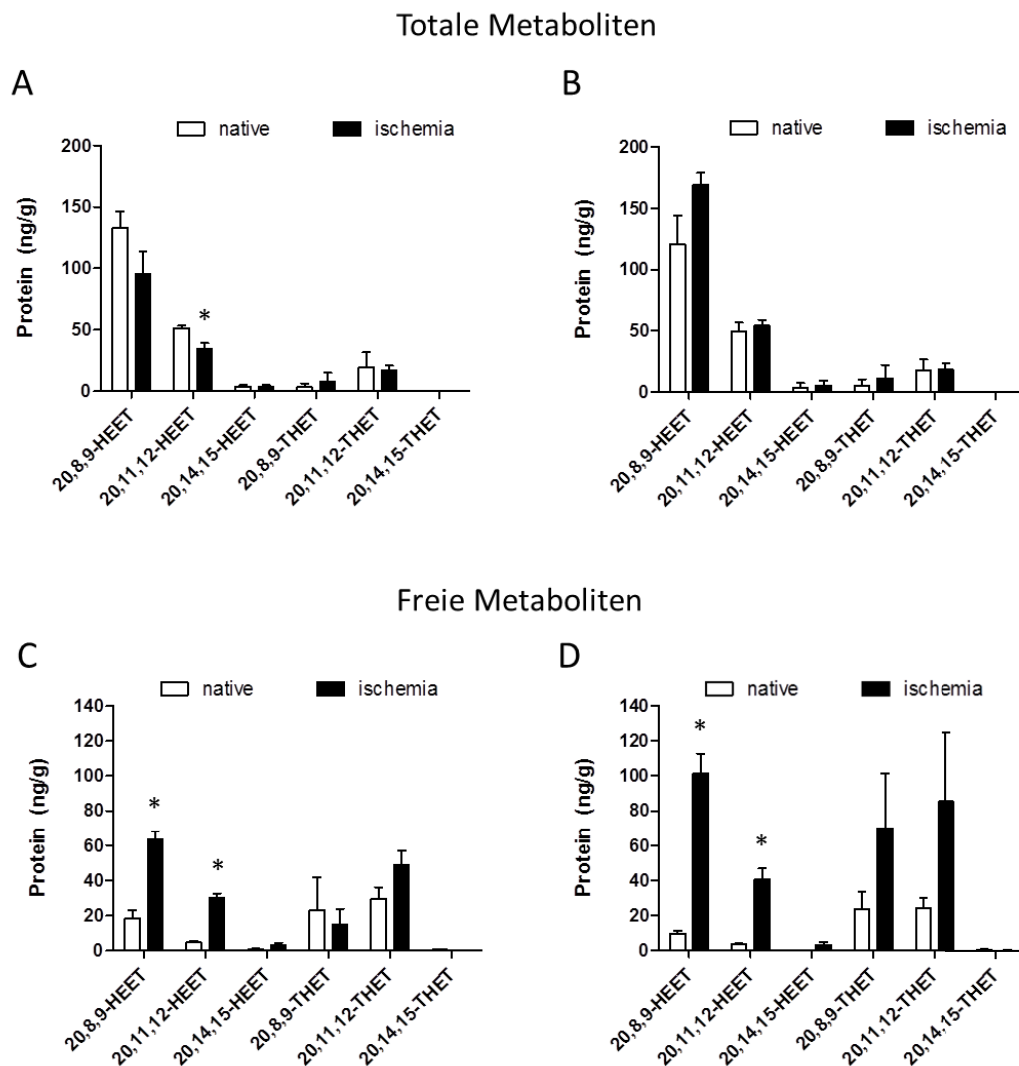
**Tabelle 3-2 Vergleich der Absolutlevel von 20-HEETs/THETs mit EETs/DHETs und 20-HETE bei renaler I/R an männlichen Rattennieren *in vivo*<sup>1</sup>**

		20-HETE	8,9-EET+DHET	11,12-EET+DHET	14,15-EET+DHET	20,8,9-HEET+THET	20,11,12-HEET+THET	20,14,15-HEET+THET
Total	Nativ	22.4	92.7	79.2	133.0	38.6	13.6	2.6
	Ischämie	25.1	76.3	70.8	131.8	18.2	6.0	0.0
	Reperfusion	66.3	59.4	52.2	121.5	14.9	6.8	0.0
Frei	Nativ	0.9	1.0	1.6	3.7	3.0	1.0	0.1
	Ischämie	6.8	8.5	17.8	12.9	3.4	0.2	0.1
	Reperfusion	3.2	1.7	2.7	5.5	3.1	0.8	0.1

<sup>1</sup> Messwerte als ng/g Feuchtmasse; Darstellung als Mittelwerte aus n=6-8

Noch deutlicher und bestätigt wurden die Befunde bei Analyse der isolierten perfundierten Nieren (vgl. Abschnitt 3.1.2). Sowohl die freien 20,8,9- als auch 20,11,12-HEETs erhöhten sich Ischämiebedingt signifikant und erreichten in der Summe mit den entsprechenden THETs vergleichbare Level der dazugehörigen EET- beziehungsweise DHET-Regioisomere, während 20,14,15-HEET und -THET in nur sehr geringer Menge auftraten, siehe Tabelle 3-3. Dies traf auf Nieren männlicher und weiblicher Ratten gleichermaßen zu (Abbildung 3-14). Bei den männlichen Nieren bestätigte sich mit Blick auf die totalen Level erneut der Befund, dass 20-HEETs aus den Membranen während der Ischämie offenbar erheblich verlorengehen. Offensichtlich erfolgt deren Freisetzung und Metabolisierung zügig, ohne dass die Neusynthese dies kompensieren konnte. Anders verhielt es sich bei den Weibchen, bei denen die Gesamt-20-HEETs schon während der Ischämiephase tendenziell anstiegen. Hervorzuheben ist bei den Weibchen insbesondere, dass die freien 20,8,9- und 20,11,12-HEETs nach Ischämie noch deutlich stärker erhöht waren (10-11-fach) als in den Nieren männlicher Ratten (3,5-6fach).

Um die Bedeutung der 20-HEETs auch bezogen auf den Menschen zu analysieren, wurden in humanen Plasmen von Patienten der CABG-Studie (vgl. Abschnitt 3.1.3) totale Level der 20-HEETs und -THETs gemessen. Wie aus Tabelle 3-4 hervorgeht, lagen 20,8,9-HEET und -THET in der Summe in vergleichbarer Menge wie 20-HETE vor, während 20,14,15-HEET und -THET in kaum detektierbarer Menge auftraten. Deutliche Zusammenhänge zwischen präoperativen 20-HEETs/THET-Leveln und dem postoperativem Auftreten von AKI oder AF waren nicht erkennbar, siehe Abbildung 3-15. Zusammengefasst ist der Nachweis über relevante Vorkommen der 20-HEETs und -THETs hiermit auch in humanem Plasma erbracht worden.



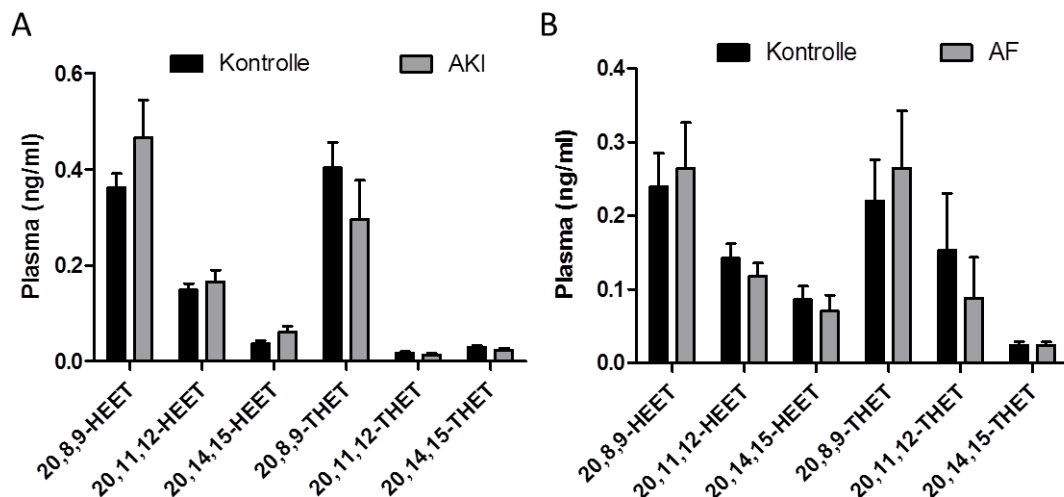
**Abbildung 3-14 20-HEETs und 20-THETs in Rattennieren im Modell der IPK**

Dargestellt sind totale (A, B) und freie (C, D) Metaboliten aus Nierengewebe männlicher (A, C) und weiblicher (B, D) Wistar-Ratten im Versuchsrahmen der IPK entsprechend Abbildung 3-9. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=4-5). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test, Dunns-Post-Test)

**Tabelle 3-3 Vergleich der Absolutlevel von 20-HEETs/THETs mit EETs/DHETs und 20-HETE bei renaler Ischämie an männlichen Rattennieren im Modell der IPK <sup>1</sup>**

		20-HETE	8,9-EET+DHET	11,12-EET+DHET	14,15-EET+DHET	20,8,9-HEET+THET	20,11,12-HEET+THET	20,14,15-HEET+THET
Total	Nativ	452	1026	930	2181	136	71	4
	Ischämie	380	1616	1508	3407	103	51	3
Frei	Nativ	70	19	37	45	41	34	1
	Ischämie	247	128	217	178	79	79	3

<sup>1</sup> Messwerte als ng/g Protein; Darstellung als Mittelwerte aus n=4-5



**Abbildung 3-15 20-HEETs und 20-THETs im Plasma humaner Proben**

Dargestellt sind totale Metaboliten im Plasma von Herz-Patienten im Versuchsrahmen der CABG-Studie entsprechend Abbildung 3-10. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n=7-39). Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt mit \* =  $p < 0,05$  (t-Test).

**Tabelle 3-4 Vergleich der präoperativen Absolutlevel von 20-HEETs/THETs mit EETs/DHETs und 20-HETE in klinischen Proben von Patienten mit postoperativem Auftreten von AKI und AF <sup>1</sup>**

	20-HETE	8,9-EET+DHET	11,12-EET+DHET	14,15-EET+DHET	20,8,9-HEET+THET	20,11,12-HEET+THET	20,14,15-HEET+THET
Kontrolle	0.8	7.1	3.2	5.0	0.8	0.2	0.1
AKI	1.1	9.0	3.2	4.6	0.8	0.2	0.1
Kontrolle	0.7	8.5	2.9	4.5	0.5	0.3	0.1
AF	1.0	8.7	3.1	4.8	0.5	0.2	0.1

<sup>1</sup> Messwerte als ng/ml Plasma; Darstellung als Mittelwerte aus n=7-39

### **3.2 Ein neues Verfahren zur chiralen Analytik von Eicosanoiden mittels RP-LC-ESI-MS/MS**

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Entwicklung eines neuartigen analytischen Verfahrens zur Quantifizierung von stereoisomeren Lipidmediatoren in biologischen und klinischen Proben. Im Einzelnen konnten dabei folgende Aufgaben gelöst werden:

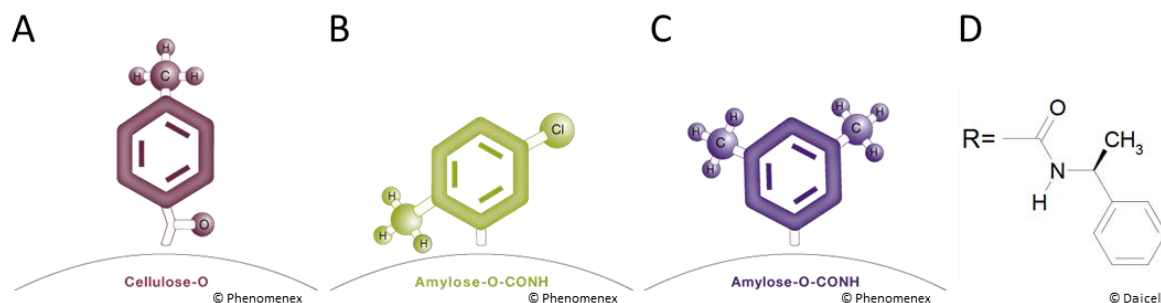
1. Etablierung der Analytik für AA-, EPA- und DHA-abgeleitete Stereoisomere der Monohydroxide und Monoepoxide
2. Verwendung wässriger Laufmittel in Kombination mit chiralen Säulen, um eine direkte Kopplung mit ESI-MS/MS zur hochsensitiven Messung zu ermöglichen
3. Auswahl geeigneter Phasen und Laufbedingungen, um eine gute chirale Trennung vieler Eicosanoide parallel zu ermöglichen
4. Kopplung der chiralen Säulen mit achiralen Säulen, um die Trennleistung in Bezug auf Regiosomere und unterschiedliche Stoffklassen zu verbessern.
5. Verwendung eines Systems bestehend aus zwei chiralen Methoden, in deren Summe alle getesteten Eicosanoide chiral trennbar sind
6. Eine Laufzeit der Gradienten von <30 min ermöglicht den wirtschaftlichen Betrieb für Routineanwendung bei vertretbaren Einschränkungen der Trennleistung
7. Die Authentizität der Methode konnte durch Validierungen sowohl in qualitativer als auch quantitativer Hinsicht - auch auf Absolutwerte bezogen - nachgewiesen werden.

Im Folgenden sind Einzelheiten zu den genannten Punkten beschrieben.



### 3.2.1 Auswahl geeigneter chiraler Säulen und Trennbedingungen

Von den kommerziell verfügbaren chiralen Säulen wurden solche ausgewählt, die ein nicht kovalent gebundenes („coated“) Polysaccharid (Cellulose oder Amylose) als Basis der stationären Phase besitzen. Die Hydroxylgruppen sind mit kurzkettingen Phenylverbindungen und teilweise zusätzlich einem Carbamat derivatisiert. Um eine optimale chirale Trennung zu erreichen, wurde eine möglichst große Retardation der hydrophoben, einfach oxidierten Eicosanoide an der Säule angestrebt. Gleichzeitig sollte der Wassergehalt des Laufmittels aus Gründen der Säulenstabilität nicht zu groß sein. Daher wurden Säulen mit eher schwach polaren Phenylverbindungen eingesetzt und beschafft (Abbildung 3-16).



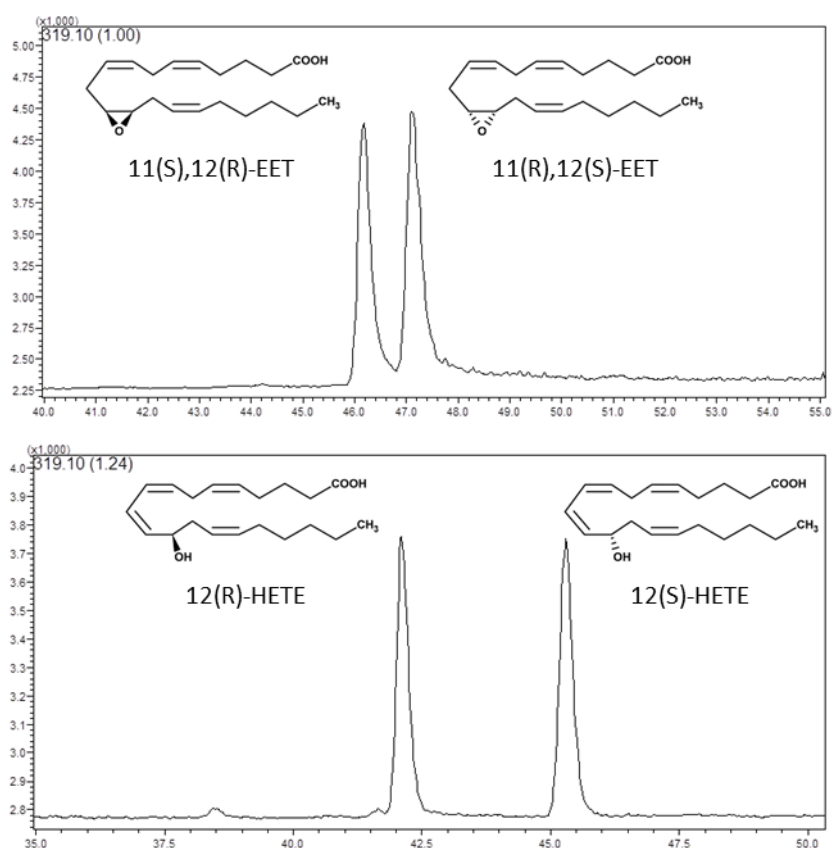
**Abbildung 3-16 Substituenten chiraler Phasen auf Polysaccharidbasis**

Dargestellt sind die Substituenten der Polysaccharide der vier getesteten chiralen Säulen. A) Lux Cellulose-3 (Phenomenex), B) Lux Amylose-2 (Phenomenex), C) Lux Amylose-1 (Phenomenex), D) Chiralpak-AS-3R (Daicel)

Für optimale Trenneigenschaften, wurden dabei stets die kleinste erhältliche Partikelgröße (3  $\mu\text{m}$ ), der kleinste Säulendurchmesser (2,0 mm; Daicel: 2,1 mm) und die hierbei größtmögliche Säulenlänge (150 mm) ausgewählt. Aufgrund der fehlenden kovalenten Bindung der stationären Phase, sind die Säulen nicht sehr druckstabil (max. 300 Bar), sodass eine Flussrate des Laufmittels von 0,4 ml/min grundsätzlich nicht überschritten werden konnte. Aus dem gleichen Grund schied die Einbeziehung von Laufmitteln wie Tetrahydrofuran oder Ethylacetat aus. Ferner war die Anwendung eines Laufmittel-Gradienten unvermeidlich – das stabile isokratische Verfahren musste aufgrund der angestrebten Trennung komplexer biologischer Proben mit gleichzeitiger Analyse zahlreicher Enantiomere verschiedener Eicosanoid-Klassen, als nicht praktikabel angesehen werden. Aus diesem Grund mussten auch von vornherein großzügige Retentionszeiten von mehr als 20 min eingeplant werden. Um Kompatibilität mit ESI-MS herzustellen, wurde grundsätzlich mit einem wässrigen Laufmittel, das 0,05% Essigsäure beinhalten, gearbeitet. Eine Variable der Methodenentwicklung war die Definition des organischen Laufmittels. Dies waren die prinzipiellen Ausgangsbedingungen, die vorab festgelegt wurden und auf deren Grundlage die Methodenetablierung gestartet wurde.

Als potentiell geeignete organische Lösungsmittel der mobilen Phase wurden für Vorversuche Acetonitril, Methanol, Ethanol und Isopropanol ausgewählt, sowie verschiedene Gemische daraus. Getestet wurden die Lösungsmittel jeweils gemischt in den Verhältnissen 10 zu 0,1/0,5/1/2/3/5. Für genauere Untersuchungen wurden die drei vielversprechendsten Komponenten ausgewählt: Acetonitril, Methanol, sowie ein Gemisch im Verhältnis 10 zu 1 daraus. Nach Analyse zahlreicher Eicosanoide zeigte sich, dass die Säule Lux Amylose-1 mit Acetonitril/Methanol 10 zu 1 sehr gute Trenneigenschaften in Bezug auf die meisten getesteten Metaboliten aufwies. Abbildung 3-17 zeigt beispielhaft die guten Trenneigenschaften am Beispiel eines Monohydroxides und eines Monoepoxides.

Standards der enantiomeren Analyten wurden von Cayman Chemicals bezogen oder selbst präpariert, sofern eine Identifizierung der Enantiomere möglich war (vgl. Abschnitt 2.4). Analyten, deren Konfiguration nicht festgestellt werden konnte, wurden als Racemate von Cayman bezogen und in der Chiralphasenanalytik entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge als „P 1“ und „P 2“ bezeichnet.

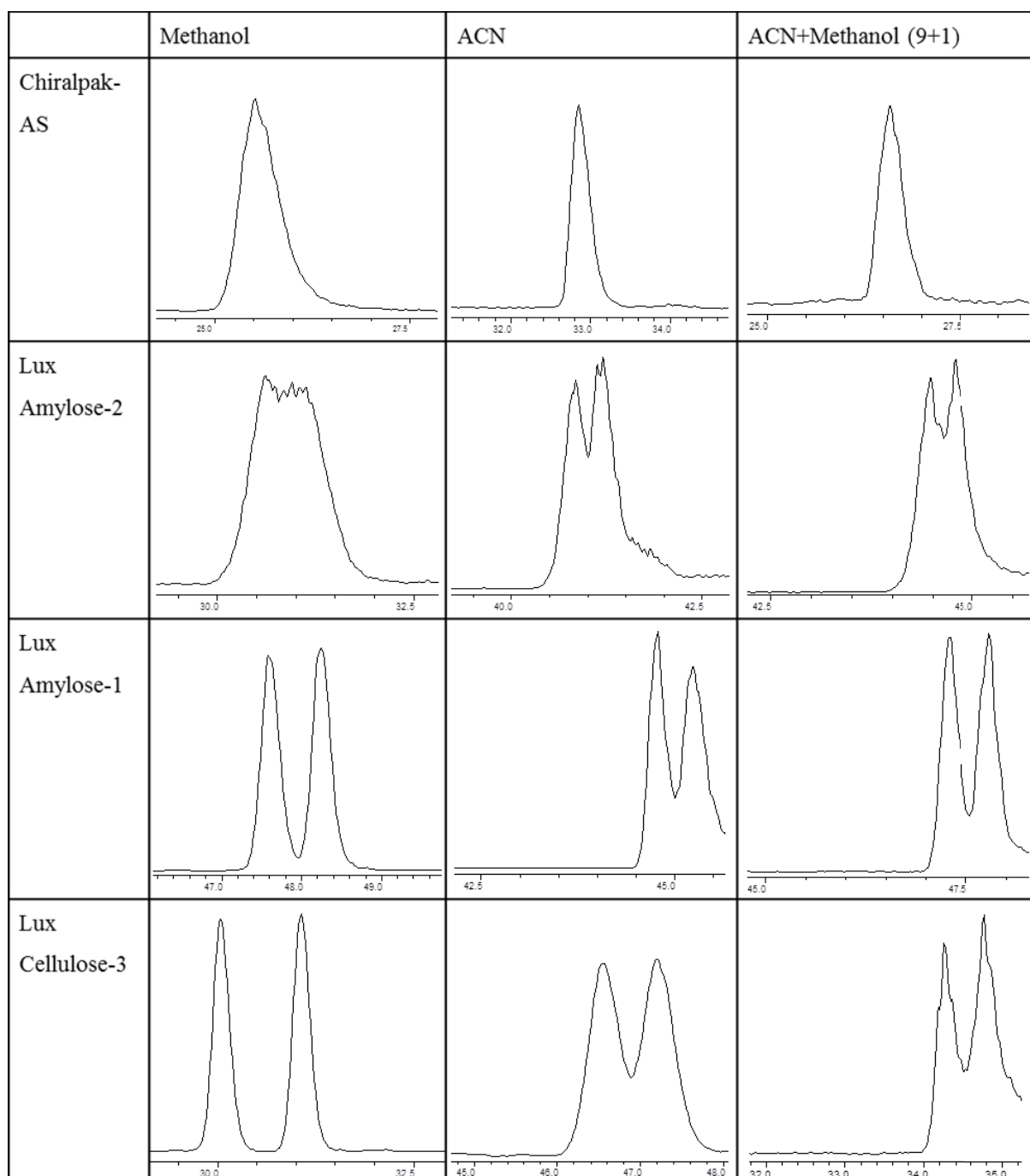


**Abbildung 3-17 Chirale Trennung von Monohydroxiden und Monoepoxiden auf Lux Amylose-1**

Dargestellt sind die chirale Trennung von 11,12-EET und 12-HETE mittels der Säule Lux-Amylose-1 und einem Gradienten von 30 → 100% Organikanteil (ACN+10% Methanol) innerhalb von 50 min. Die Messung erfolgte an einer Single-Quad-MS (Shimadzu).

Während das in Abbildung 3-17 gezeigte System eine hervorragende Trennung aller getesteten Monohydroxide ermöglichte, erwies es sich für einige Monoepoxide (14,15-EET, 8,9-EEQ, 17,18-EEQ, 19,20-EDP) als prinzipiell ungeeignet. Eine Basislinientrennung dieser Enantiomere war auch bei großen Retentionszeiten von mehr als 60 min nicht möglich. Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit schloss Monoepoxide jedoch mit in die Analytik ein, um den Mangel geeigneter chiraler Methoden nach bisherigem Stand der Wissenschaft zu beseitigen und die biologische Aktivität und pathophysiologische Regulation der Monoepoxidvorkommen besser erforschen zu können. Daher sollte in der weiteren Methodenetablierung nun ein zweites System gefunden werden, das es ermöglicht, die kritischen Monoepoxide in ihre Enantiomere aufzulösen.

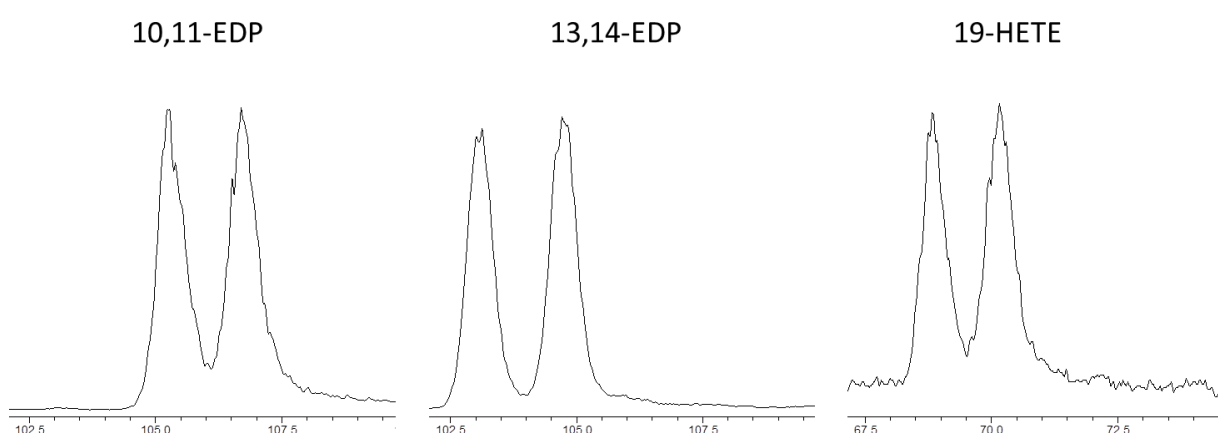
Am Beispiel von 14,15-EET werden in Abbildung 3-18 die untersuchten Auswirkungen der chiralen Säule und des Laufmittels auf die Trennung der Enantiomere veranschaulicht. Die Auflösung der Enantiomere von 17,18-EEQ und 19,20-EDP veränderte sich in vergleichbarer Weise (Daten nicht gezeigt). Chiralpak-AS erbrachte mit keinem der getesteten Laufmittel eine chirale Trennung. Lux Amylose-2 ermöglichte eine ansatzweise Trennung mit Acetonitril. Lux Amylose-1 zeigte hier eine deutlichere Trennung, in Kombination mit Methanol als organische Komponente wurde nahezu Basislinientrennung erreicht. Eine sehr gute Trennung mit Methanol ergab sich bei Verwendung der Lux Cellulose-3 (Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18 Chirale Trennung von 14,15-EET in Abhängigkeit von Säule und organischer Komponente der mobilen Phase**

Das verwendete Laufmittel enthielt in allen Fällen Wasser und 0,05% Essigsäure. Gradient und Laufmittelzusammensetzung wurden abhängig von der Säule und organischen mobilen Phase individuell angepasst, sodass die 14,15-EET Enantiomere stets eine Retentionszeit von 25 bis 50 min aufwiesen (die jeweilige Retentionszeit ist den einzelnen Panels zu entnehmen). Die X-Achse ist stets gleich skaliert, sodass die Peakbreiten direkt vergleichbar sind. Ein gutes Trennergebnis für die Enantiomere von 14,15-EET wurde in der Kombination aus der Säule Lux Cellulose-3 und Methanol als Organikkomponente des Laufmittels erreicht. Eine mäßige Trennung war auch auf der Säule Amylose-1 in Kombination mit Methanol, oder einem Gemisch aus Methanol und ACN als Organikkomponente möglich. Die nur geringfügig anders aufgebaute Säule Amylose-2 ermöglichte hingegen keine zufriedenstellende Trennung der 14,15-EET-Enantiomere. Die Messungen erfolgten an einer Single-Quad-MS (Shimadzu).

Bei Verwendung der Lux Amylose-1 mit Acetonitril und Methanol im Gemisch 10:1 als organische Komponente, sowie der Lux Cellulose-3 mit Methanol als organische Komponente, ergab sich bei einem Fluss von 0,2 ml/min und max. 60 min Retentionszeit eine chirale Basislinientrennung der meisten getesteten Monoepoxy- und Monohydroxy-Eicosanoide, sowie auch zahlreicher Dirole der Epoxide. Details der Laufbedingungen sind Abschnitt 2.5 zu entnehmen. Die Retentionszeiten aller getesteten Enantiomere sind in den Tabellen 3-5 und 3-6 zusammengefasst. Für 10,11-EDP, 13,14-EDP und 19-HETE wurde kein Verfahren für eine effektive Trennung der Enantiomere gefunden. Wie aus Abbildung 3-19 hervorgeht, können jedoch auch diese kritischen Metaboliten auf Lux Amylose-1 im Prinzip erfolgreich getrennt werden, wenn Retentionszeiten von mehr als 60 min in Kauf genommen werden.



**Abbildung 3-19 Chirale Trennung kritischer Metaboliten**

Dargestellt ist die chirale Trennung von 10,11-EDP, 13,14-EDP und 19-HETE bei Verwendung der Säule Lux Amylose-1 mit einem linearen Gradienten aus Acetonitril/Methanol/Wasser/Essigsäure von 27:3:70:0,05 (v/v/v/v) auf 90/10/0/0,05 (v/v/v/v) innerhalb von 150 min. Die Flussrate betrug 0,2 ml/min, die Säulentemperatur 40°C. Die Messung erfolgte an einer Single-Quad-ESI-MS (Shimadzu). Unter diesen Bedingungen wurde eine deutliche Auflösung der Enantiomere von 10,11-EDP und 19-HETE, sowie Basislinientrennung für 13,14-EDP erreicht.

Damit wurde eine zentrale Zielstellung der Methodenetablierung erreicht. Das System bestehend aus den beiden chiralen Säulen Lux Amylose-1 und Lux Cellulose-3 konnte in Verbindung mit den optimierten Laufmitteln als Vorlage dienen, um die Chiralphasenanalytik auf ein hochsensitives LC-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung endogener Eicosanoid-Enantiomere in komplexen biologischen Proben anzuwenden.

Tabelle 3-5 Retentionszeiten von AA- und EPA-Metaboliten in der chiralen LC-MS-Analytik (min)

AA-Metaboliten	Cellulose-3	Amylose-1	EPA-Metaboliten	Cellulose-3	Amylose-1
5(R)-HETE	18,9	40,4	5(R)-HEPE	18,0	37,2
5(S)-HETE		44,7	5(S)-HEPE		40,6
8-HETE P1	19,8	40,1	9(R)-HEPE	18,4	36,7
8-HETE P2		45,1	9(S)-HEPE		39,7
9(R)-HETE	18,9	40,0	12(R)-HEPE	16,5	39,3
9(S)-HETE		42,9	12(S)-HEPE		43,0
11(R)-HETE	18,5	39,2	15(R)-HEPE	16,2	37,2
11(S)-HETE		43,4	15(S)-HEPE		40,0
12(R)-HETE	16,9	43,2	18-HEPE P1	16,4	36,0
12(S)-HETE		47,0	18-HEPE P2	18,8	38,1
15(R)-HETE	18,0	41,5	8,9-EEQ P1	26,6	46,2
15(S)-HETE		48,3	8,9-EEQ P2	29,0	
16(R)-HETE	11,5	38,7	11,12-EEQ P1	26,7	44,3
16(S)-HETE		45,5	11,12-EEQ P2		44,9
17(R)-HETE	13,8	42,0	14,15-EEQ P1	25,2	46,2
17(S)-HETE		41,5	14,15-EEQ P2	27,1	47,3
19(R)-HETE	14,5	38,7	17(R),18(S)-EEQ	24,6	43,8
19(S)-HETE		38,3	17(S),18(R)-EEQ	26,0	
8(R),9(S)-EET	26,7	48,8	5,6-DiHETE P1	10,3	30,6
8(S),9(R)-EET	28,8	49,8	5,6- DiHETE P2		33,5
11(R),12(S)-EET	26,7	49,4	11,12-DiHETE P1	8,0	34,8
11(S),12(R)-EET		48,4	11,12-DiHETE P2	9,0	36,0
14(R),15(S)-EET	27,2	48,5	14,15-DiHETE P1	6,4	33,7
14(S),15(R)-EET	28,5	49,2	14,15-DiHETE P2		34,9
8,9-DHET P1	10,2	36,0	17,18-DiHETE P1	6,0	33,9
8,9-DHET P2		39,6	17,18-DiHETE P2		34,5
11,12-DHET P1	8,0	37,4			
11,12-DHET P2		38,4			
14,15-DHET P1	7,5	39,3			
14,15-DHET P2		40,6			

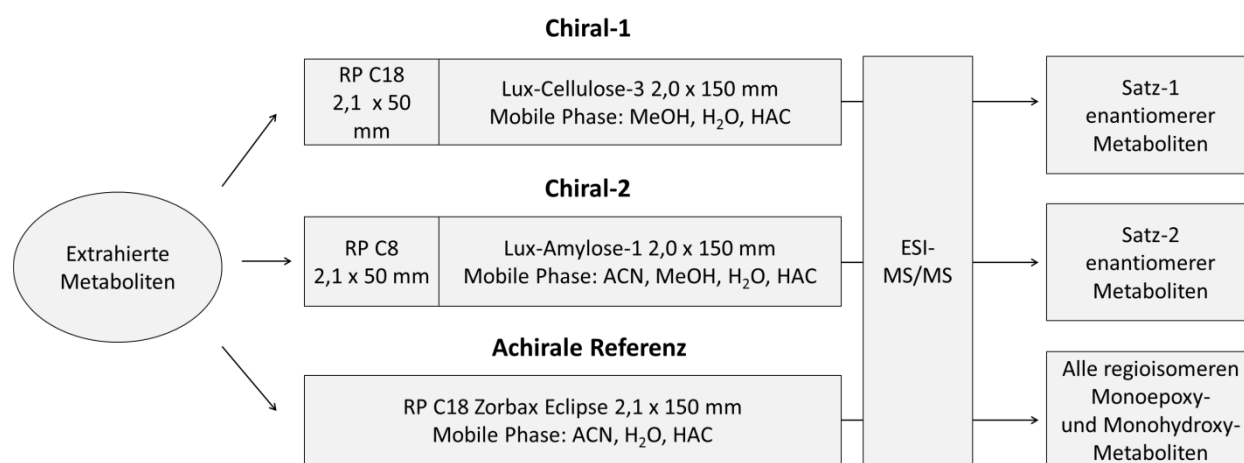
**Tabelle 3-6 Retentionszeiten von DHA- und LA-Metaboliten in der chiralen LC-MS-Analytik (min)**

DHA-Metaboliten	Cellulose-3	Amylose-1	LA-Metaboliten	Cellulose-3	Amylose-1
10-HDHA P1	24,6	40,5	9-HODE P1	15,2	45,2
10-HDHA P2		44,1	9-HODE P2	16,6	56,2
14(S)-HDHA	23,4	43,3	13-HODE P1	13,5	42,4
17(R)-HDHA	23,0	41,0	13-HODE P2		61,0
17(S)-HDHA		43,5	9,10-EpOME P1	23,6	54,8
20-HDHA P1	23,0	39,4	9,10-EpOME P2		56,2
20-HDHA P2	24,7	41,6	12,13-EpOME P1	24,5	55,6
7,8-EDP P1	31,8	48,2	12,13-EpOME P2	25,9	56,9
7,8-EDP P2		51,4			
10,11-EDP P1	31,6	48,8			
10,11-EDP P2		49,3			
13,14-EDP P1	31,5	47,9			
13,14-EDP P2		48,3			
16,17-EDP P1	29,6	48,6			
16,17-EDP P2	31,6	49,5			
19(R),20(S)-EDP	29,8	48,8			
19(S),20(R)-EDP	31,7				
7,8-DiHDPA P1	14,3	35,9			
7,8-DiHPDA P2					
10,11-DiHDPA P1	16,6	37,9			
10,11-DiHDPA P2		39,5			
13,14-DiHDPA P1	18,1	38,7			
13,14-DiHDPA P2		39,7			
16,17-DiHDPA P1	11,0	37,7			
16,17-DiHDPA P2		38,4			
19,20-DiHDPA P1	10,3	38,0			
19,20-DiHDPA P2		38,7			

### **3.2.2 Säulenkopplung und Tandem-Massenspektrometrie**

Die polysaccharidbasierten chiralen Säulen Lux-Amylose-1 und Lux Cellulose-3 sind grundsätzlich kompatibel mit polaren Laufmitteln und wurden in Abschnitt 3.2.1. mitsamt geeigneter Laufbedingungen zur Chiralphasenanalytik ausgewählt. Somit waren die Voraussetzung erfüllt, um die chirale LC unter reverse Phasen-Bedingungen in Kooperation mit der Lipidomix GmbH Berlin auf ESI-MS/MS im negativen Ionisierungsmodus zu übertragen, um eine hochsensitive und spezifische Detektion getrennter Stereoisomere zu ermöglichen [124].

Das final etablierte Messsystem der ESI-MS/MS-Chiralphasenanalytik für biologische und klinische Proben ist in Abbildung 3-20 dargestellt. Für das System der Lux Cellulose-3 (150 x 2,0 mm, 3 µm Partikel), gekoppelt mit der achiralen Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm Partikel) wurde die Bezeichnung „Chiral-1“ gewählt. Die mobile Phase war ein linearer Gradient aus Methanol/Wasser/Essigsäure von 70:30:0.05 auf 80:20:0.05 (v/v/v) innerhalb 16 min bei einer Flussrate von 0.4 ml/min, gefolgt von einem Waschschrift mit 100% Methanol über 4 min. Das System „Chiral-2“ bestand aus Lux Amylose-1 (150 x 2,0 mm, 3 µm Partikel) gekoppelt mit der achiralen Agilent ZORBAX SB-C8 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm Partikel). Die mobile Phase war ein linearer Gradient aus Acetonitril/Methanol/Wasser/Essigsäure von 27:3:70:0.05 auf 63:7:30:0.05, (v/v/v/v) innerhalb 30 min bei einer Flussrate von 0.4 ml/min. Ein drittes System bestehend aus einer achiralen Säule Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 2,1 mm, 1,8 µm Partikel), wurde zur Validierung der chiralen Analytik hinzugezogen. Die Chromatografie erfolgte als linearer Gradient bei einer Flussrate von 0,3 ml/min, beginnend mit Acetonitril/Wasser/Essigsäure im Verhältnis von 5:95:0,05 (v/v/v) für 0,5 min, gefolgt von einem Anstieg auf 56:44:0,05 innerhalb 5 min, auf 61:39:0,05 in 5 min und 87:13:0.05 in 13 min, gefolgt von einem Waschschrift mit 98:2:0.05 über 6,5 min. Die Säulentemperatur betrug stets 40°C und das Injektionsvolumen 10-15 µl. Die MS/MS war ein Agilent 6490 Triple Quad (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) mit ESI im negativem Modus, gekoppelt mit einem UHPLC-System (Agilent 1290 infinity series).



**Abbildung 3-20 Schema der chiralen LC-ESI-MS/MS Analytik von biologischen Proben**

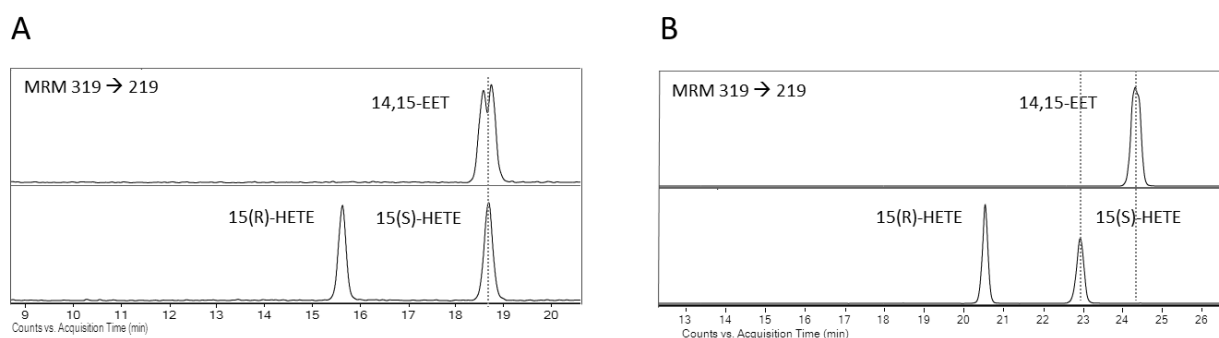
Dargestellt ist die im Rahmen dieser Arbeit etablierte analytische Herangehensweise zur Bestimmung von Eicosanoid Enantiomeren in biologischen und klinischen Proben. Die Metaboliten wurden aus Gewebe extrahiert und über zwei verschiedene chirale Säulen chromatografiert. Beide Säulen wurden jeweils upstream mit einer kurzen achiralen Säule gekoppelt, um eine Vortrennung regioisomerer Monohydroxide und –Monoepoxide zu erreichen. Die beiden mit „Chiral-1“ und „Chiral-2“ bezeichneten Methoden ermögliche die Trennung bestimmter Gruppen enantiomerer Metaboliten, wobei ein Großteil der untersuchten Monoepoxide auf Lux Cellulose-3, und alle Monohydroxide sowie einige weitere Monoepoxide auf Lux Amylose-1 aufgelöst werden. Eine dritte, „achirale“ Methode beinhaltete eine RP-C18-Säule und wurde in die Analytik einbezogen, um Referenzdaten zu beziehen und eine Validierung der Chiralphasen-Analytik vorzunehmen. Alle drei Säulensysteme wurden unter reverse-Phasen-Bedingungen betrieben und zur Detektion und Quantifizierung mit ESI-MS/MS gekoppelt.



Zur Quantifizierung diente eine 10-Punkt-Kalibriergerade, die anhand des Verhältnisses der Intensität aus Analyt und internem Standard (IS) errechnet wurde. Dabei wurden jeweils 10 µl Stammlösung in Acetonitril injiziert, die 0 bis 25 ng des Analyten und 5 ng IS pro 100 µl enthielt. Der IS bestand aus den deuterierten Analyt-Analoga 15(S)-HETE-d8 und  $\pm$ 8,9-EET-d11 und diente entsprechend seiner Chemie als quantitative Bezugsgröße für alle untersuchten Monohydroxide beziehungsweise Monoepoxide. Bei 8,9-EET-d11 wurde die Summe der Peakflächen beider Enantiomere als Bezugsgröße herangezogen. Die Handhabung des IS bei der Extraktion der Gewebe erfolgte entsprechend der Ausführungen in Abschnitt 2.1.4.

Ein spezielles Problem war, dass sich einige Enantiomere unterschiedlicher Metaboliten grundsätzlich nicht spezifisch detektieren ließen, weil sie bei gleicher Retentionszeit auch das gleiche MRM aufwiesen, sodass sie trotz Tandem-Massenspektrometrie nicht unterscheidbar waren. Ein Beispiel dafür waren 15-HETE und 14,15-EET auf Lux Amylose-1. Bei identischem MRM (319 → 219) koeluierten 15(S)-HETE und das nicht getrennte 14,15-EET (vgl. Abbildung 3-21A).

Die Lösung des Problems brachte eine 50 mm kurze achirale RP-C8 oder -C18-Säule, die upstream mit der chiralen Säule direkt gekoppelt wurde. Abbildung 3-21B illustriert den damit erzielten Effekt.



**Abbildung 3-21 Trennung von Monohydroxiden und Monoepoxiden durch Vorschalten einer achiralen Säule vor die chirale Phase**

Dargestellt ist die chirale Trennung der Enantiomere von 14,15-EET und 15-HETE bei Verwendung **(A)** der Säule Lux Amylose-1 und **(B)**, bei Kopplung der Lux Amylose-1 mit einer achiralen Säule Zorbax RP-C8 upstream (System „Chiral-2“). 15(S)-HETE und  $\pm$ 14,15-EET weisen dasselbe Mutter-Ion ( $m/z = 319,3$ ) und auch dasselbe dominante Fragmentation ( $m/z = 219,2$ ) auf, was eine massenspektrometrische Unterscheidung unmöglich macht. Für eine fehlerfreie Analytik, ist in solchen Fällen eine gute chromatografische Auflösung essentiell. Durch die Kopplung der chiralen Säule mit einer achiralen Säule, wurde die erforderliche Trennung erreicht. Die Chromatografie erfolgte bei einem linearen Gradienten aus Acetonitril/Methanol/Wasser/Essigsäure von 27:3:70:0,05 (v/v/v/v) auf 63/7/30/0,05 (v/v/v/v) innerhalb von 30 min. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min, die Säulentemperatur 40°C. Die Messung erfolgte mittels ESI-MS/MS (Agilent).

Eine weitere Zielstellung bei der Übertragung der Analytik auf ESI-MS/MS war die Optimierung der Methode hinsichtlich ihrer Stabilität und Reproduzierbarkeit, um eine routinemäßige Anwendung der Chiralphasenanalytik effizient zu ermöglichen. Einerseits betraf dies die Länge des linearen Gradienten. Durch UPLC-Komponenten mit kleinen Kapillaren und geringem Totvolumen, sowie einer Vergrößerung der Flussrate auf 0,4 ml/min konnte die Länge der Gradienten für Chiral-1 auf 16 min und für Chiral-2 auf 30 min begrenzt werden. Ein anderer Aspekt war die Stabilität der Säulen und reproduzierbare Retentionszeiten. Chirale Säulen sind in der Anschaffung erheblich teurer als achirale Säulen, weshalb eine dauerhaft gleichbleibende Performance wichtig und Voraussetzung für einen wirtschaftlichen Betrieb ist. In der Literatur [91] wurde die verringerte Haltbarkeit der nicht-kovalent gebundenen Polysaccharidsäulen insbesondere unter RP-Bedingungen beschrieben, und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab sich zunächst eine unbefriedigende Säulenstabilität über weniger als 250 Läufe, sowie Inkonsistenz der Retentionszeiten. Durch folgende Maßnahmen konnten die Probleme beseitigt und eine gute Säulenstabilität über > 1000 Läufe hergestellt werden:

- Equilibrieren des Säulensystems durch stufenweise Regulation der Flussrate beim Hochfahren des Systems von 0 auf 0,4 ml/min innerhalb von 10 min, um starke Druckschwankungen zu vermeiden
- Einlaufzeit der Säulen von einer Stunde oder mehr; ausreichender Einlauf wurde an Peakform und Retentionszeit von Standardsubstanzen geprüft
- Zwischen einzelnen Analyseläufen, Säulen über mindestens 15 min equilibrieren
- Vermeidung von Wasseranteilen des Laufmittels von mehr als 70%
- Eine achirale Säule upstream fängt Kontaminanten ab und wirkt als Puffer für Druckschwankungen
- Einhaltung einer konstanten Säulentemperatur
- Lagerung der Säulen generell in 95% Methanol oder Acetonitril, ohne Säure
- Herstellerseitige Hinweise zum Umgang mit den Säulen genau einhalten, insbesondere den Maximaldruck von 300 Bar, sowie die Angaben zu kompatiblen Lösungsmitteln und -Zusätzen.

### **3.2.3 Validierung der chiralen LC-MS/MS-Analytik**

Die in Abschnitt 3.2.2 beschriebene ESI-MS/MS-Chiralphasenanalytik für biologische und klinische Proben wurde einer Validierung unterzogen, die sich an der Guidance der U. S. Food and Drug Administration (FDA) orientierte [125]. Das Validierungsprogramm wurde um kritische Parameter der Chiralphasenanalytik (Stabilität der Retentionszeiten, chromatografische Auflösung, Authentizität quantitativer Daten) ergänzt. Zielstellung war es hierbei, die Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit der Methode in Hinblick auf Messbedingungen und Messergebnisse in qualitativer wie quantitativer Hinsicht, zu beschreiben.

### 3.2.3.1 Standards und Kalibrierung

In die Validierung wurde eine Auswahl der in Tabelle 3-5 und Tabelle 3-6 aufgelisteten Analyten einbezogen, wobei der Schwerpunkt auf enantiomere Monoepoxide und Monohydroxide gelegt wurde, mit den Precursor-Fettsäuren AA, EPA und DHA. In der Summe waren dies 48 einzelne Analyten in Gestalt von 24 Enantiomeren-Paaren. Die zugrundeliegenden MS-Parameter sind in Tabelle 3-7 aufgelistet. Sie sind für korrespondierende Enantiomere gleich, da die Mutter-Ionen identisch sind und die Fragmentierung eines Moleküls in der Kollisionszelle unabhängig von dessen räumlicher Konfiguration erfolgt. Die Kollisionsenergie (CE) wurde bereits bei früherer Etablierung achiraler Messverfahren für jedes Regioisomer optimiert [80] und für die Chiralphasenanalytik mit kleineren Anpassungen übernommen. Individuell neu definiert wurden Quantifier und Qualifier, da deren Charakter als diagnostisches Fragment auch von der Retentionszeit und auftretenden Masseüberlagerungen abhängt und so für chromatografische Methoden individuell bestimmt werden sollten. (Erläuterung massenspektrometrischer Begriffe vgl. Abschnitt 1.6).

**Tabelle 3-7 Messparameter MS/MS**

Analyt <sup>1</sup>	CE <sup>2</sup> (Volt)	Precursor- Ion	Quantifier	Qualifier	Analyt <sup>1</sup>	CE <sup>2</sup> (Volt)	Precursor -Ion	Quantifier	Qualifier
5-HETE	12	319.3	115.1	191.1	8,9-EET	7	319.3	155.0	127.0
9-HETE	15	319.3	151.1	123.1	11,12-EET	9	319.3	167.1	179.1
11-HETE	14	319.3	167.1	149.1	14,15-EET	9	319.3	219.0	155.0
12-HETE	13	319.3	179.2	257.1	8,9-EEQ	7	317.3	155.0	149.0
15-HETE	11	319.3	219.2	121.1	11,12-EEQ	11	317.3	167.1	179.1
19-HETE	18	319.3	275.2	231.2	14,15-EEQ	11	317.3	207.0	219.0
5-HEPE	9	317.3	115.1	201.1	17,18-EEQ	7	317.3	259.0	273.0
9-HEPE	13	317.3	167.1	149.1	7,8-EDP	7	343.1	189.2	109.1
12-HEPE	13	317.3	179.1	255.1	10,11-EDP	9	343.1	153.1	190.1
15-HEPE	11	317.3	219.2	175.1	13,14-EDP	9	343.1	193.1	205.1
18-HEPE	11	317.3	259.2	215.2	16,17-EDP	9	343.1	233.0	201.0
17-HDHA	11	343.1	245.2	201.1	19,20-EDP	7	343.1	241.0	133.0

<sup>1</sup> Die Messparameter sind identisch für korrespondierende Enantiomere

<sup>2</sup> Kollisionsenergie (CE)

Zur Durchführung der Validierung dienten drei Mixturen, bestehend aus Standardsubstanzen (QCs), siehe Tabelle 3-8. Sämtliche zu validierende Analyten waren in einer anhand der individuellen Kalibriergeraden optimierten Konzentration in den QCs enthalten. Damit eigneten sich QC 1 für die Messung nahe des Lower Limits Of Quantitation (LLOQ), QC 3 nahe des Upper Limits Of Quantitation und QC 2 zwischen QC 1 und QC 3. Zur Quantifizierung wurde den Mixturen außerdem IS (Vgl. Abschnitt 2.1.4) zugesetzt.

**Tabelle 3-8 Quality control (QC) Mixturen <sup>1</sup>**

Compound	QC 1	QC 2	QC 3	Compound	QC 1	QC 2	QC 3
5(R)-HETE	0.25	2.5	10.0	8(R),9(S)-EET	0.5	5.0	25.0
5(S)-HETE				8(S),9(R)-EET			
9(R)-HETE	0.25	2.5	10.0	11(R),12(S)-EET	0.5	2.5	10.0
9(S)-HETE				11(S),12(R)-EET			
11(R)-HETE	0.25	2.5	10.0	14(R),15(S)-EET	0.5	5.0	25.0
11(S)-HETE				14(S),15(R)-EET			
12(R)-HETE	0.25	2.5	10.0	8,9-EEQ peak 1	0.5	5.0	25.0
12(S)-HETE				8,9-EEQ peak 2			
15(R)-HETE	0.25	2.5	10.0	11,12-EEQ peak 1	0.25	2.5	10.0
15(S)-HETE				11,12-EEQ peak 2			
19(R)-HETE	0.5	2.5	10.0	14,15-EEQ peak 1	0.5	5.0	25.0
19(S)-HETE				14,15-EEQ peak 2			
5(R)-HEPE	0.25	2.5	10.0	17(R),18(S)-EEQ	0.5	5.0	25.0
5(S)-HEPE				17(S),18(R)-EEQ			
9(R)-HEPE	0.25	2.5	10.0	7,8-EDP peak 1	0.25	2.5	10.0
9(S)-HEPE				7,8-EDP peak 2			
12(R)-HEPE	0.5	2.5	10.0	10,11-EDP peak 1	0.25	2.5	10.0
12(S)-HEPE				10,11-EDP peak 2			
15(R)-HEPE	0.25	2.5	10.0	13,14-EDP peak 1	0.25	2.5	10.0
15(S)-HEPE				13,14-EDP peak 2			
18-HEPE Peak 1	0.25	2.5	10.0	16,17-EDP peak 1	0.5	5.0	25.0
18-HEPE Peak 2				16,17-EDP peak 2			
17(R)-HDHA	0.5	2.5	10.0	19(R),20(S)-EDP	0.5	5.0	25.0
17(S)-HDHA				19(S),20(R)-EDP			

<sup>1</sup> ng absolut per 5 ng IS.

### 3.2.3.2 Validierung chromatografischer Parameter

In Tabelle 3-6 und 3-7 sind die Validierungsergebnisse zu chromatografischen Parametern für die Systeme Chiral-1 und Chiral-2 zusammengefasst. Zunächst einmal ergaben sich Aussagen über die Sensitivität der Methode. Das Lower limit of quantitation (LLOQ) wurde als die Konzentration definiert, bei der sich ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von  $>10$  ergab, wobei die Chromatogramme zur Auswertung grundsätzlich zweifach nach Gauß geglättet wurden und das Rauschen in einem geeigneten signalfreien Intervall von einer Peakbreite bestimmt wurde. Die Auswertung der Chromatogramme wurde stets mittels der Mass Hunter Software von Agilent durchgeführt. Mit Ausnahme von 12-HEPE war LLOQ für korrespondierende Enantiomere stets gleich. Für die meisten Enantiomere lag LLOQ unterhalb von 0,05 ng absolut, was  $<5$  pg on column oder auf die Extraktion von Analyten aus Geweben bezogen,  $<0,1$  ng/ml Plasma beziehungsweise  $<2,5$  ng/g Feuchtmasse entspricht. Das größte LLOQ betrug 0,25 ng absolut (entspricht 0,5 ng/ml Plasma oder 12,5 ng/g Feuchtmasse). Der lineare Messbereich reichte stets bis auf 10-25 ng absolut (20-50 ng/ml Plasma oder 500-1250 ng/g Feuchtmasse). Es wurde somit ein linearer Messbereich etabliert, der eine Quantifizierung aller Analyten von mindestens 0,25 bis 10 ng absolut ermöglicht, was den biologisch und klinisch auftretenden endogenen Konzentrationen der Enantiomere gut entspricht. Eine Ausnahme bildeten lediglich die Enantiomere von 11,12-EET, deren LLOQ 0,5 ng absolut betrug. Die Linearität der Kalibriergeraden war über diesen Bereich mit einem Korrelationskoeffizient ( $R^2$ )  $> 0,99$  exzellent.

Entscheidend für Angaben zur Sensitivität ist das Vorliegen authentischer Standards. Die Konzentration der von Cayman erworbenen Standards wurde mittels Peakflächenanalyse an der Single-Quad-MS vom Autor nachbestimmt. Als Referenz zur Ermittlung der tatsächlichen Konzentration dienten einerseits Cayman-Standards höherer Qualität (12(S)-HETE „Lipid Maps“ und 14,15-EET „Lipid Maps“) als auch die Einwaage von synthetisch hergestelltem, gereinigtem 20-HEPE.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Messbereich der Methode auf endogene Vorkommen der Analyten in biologischen und klinischen Proben optimal zugeschnitten wurde und die Quantifizierung anhand authentischer, individuell geprüfter Standards erfolgte.

Spezifische Validierungskriterien waren die chromatografische Auflösung korrespondierender Enantiomere, sowie deren Retentionszeitstabilität. Diese Parameter sind für die Chiralphasenanalytik von besonderer Wichtigkeit, weil Enantiomere aufgrund identischer MRMs massenspektrometrisch nicht unterschieden werden können und deren Auflösung einzig durch die spezifische Elution von der Säule zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wird. Die Tabellen 3-9 und 3-10 geben die Auflösung R sowie die Retentionszeitstabilität der Analyten wider. Die relative Standardabweichung der Retentionszeit betrug in Bezug auf 9 aufeinanderfolgende Messungen von QC 1-3 maximal 0,3% für das System „Chiral-1“ sowie maximal 0,1% für das System „Chiral-2“, was einer ausgezeichneten Stabilität bei einer ausreichend equilibrierten Säule entspricht. Für die meisten korrespondierenden Enantiomere wurde eine Basislinientrennung ( $R \leq 1,5$ ) erreicht. Aus wirtschaftlichen Gründen wurde die Laufzeit der Chiral-2-Methode auf 30 min begrenzt, daraus ergab sich für 19-HETE, 11,12-EEQ und 13,14-EDP eine nur moderate Auflösung ( $R \geq 0,6$ ). Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit sowohl der Auflösung als auch Retentionszeiten dieser Analyten, war eine fehlerfreie Quantifizierung dennoch möglich. 10,11-EDP musste aus dem Messprogramm herausgenommen werden, da die chromatografische Trennung unter diesen Bedingungen nicht ausreichte. Um eine korrekte qualitative Zuordnung der Messsignale auch für diese Analyten sicherzustellen, sollte bei routinemäßiger Anwendung der Methode infolge von 10 gemessenen Proben jeweils eine Mischung aus Standardsubstanzen gemessen werden.

**Tabelle 3-9 Chromatografische Parameter der “Chiral-1” Methode**

Analyt	LLOQ (ng)	Linear Range (ng)	R <sup>2</sup>	Retentionszeit (rel. SD)	Auflösung R <sup>c</sup> (rel. SD) <sup>b</sup>
8(R),9(S)-EET	0.25	0.25 - 25	0.9988	13.02 (0.3)	2.0 (3.4)
8(S),9(R)-EET	0.25		0.9989	13.93 (0.2)	
14(R),15(S)-EET	0.10	0.1 - 25	0.9985	12.98 (0.2)	1.6 (5.7)
14(S),15(R)-EET	0.10		0.9984	13.68 (0.2)	
8,9-EEQ peak 1	0.10	0.05 - 25	0.9994	12.23 (0.3)	2.5 (9.4)
8,9-EEQ peak 2	0.10		0.9975	13.23 (0.4)	
14,15-EEQ peak 1	< 0.05	0.05 - 25	0.9986	11.54 (0.3)	2.2 (2.9)
14,15-EEQ peak 2	< 0.05		0.9977	12.41 (0.2)	
17(R),18(S)-EEQ	< 0.05	0.1 - 25	0.9986	11.20 (0.2)	1.5 (4.3)
17(S),18(R)-EEQ	< 0.05		0.9985	11.78 (0.2)	
16,17-EDP peak 1	0.25	0.1 - 25	0.9986	14.69 (0.2)	2.7 (4.9)
16,17-EDP peak 2	0.25		0.9987	15.89 (0.4)	
19(R),20(S)-EDP	0.25	0.25 - 25	0.9989	14.68 (0.3)	2.2 (5.4)
19(S),20(R)-EDP	0.25		0.9991	15.65 (0.3)	

a) ng absolut

b) Relative Standardabweichung (%) bezogen auf 9 QC-Proben bei drei verschiedenen Konzentrationen (QC 1-3)

c) 
$$R = 1,18 \cdot \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{FWHM_1 + FWHM_2} \right)$$
; Formel entsprechend Literatur [126]  $t_R$ : Retentionszeit (min);  
FWHM: Full peak width at half maximum (min)

**Tabelle 3-10 Chromatografische Parameter der “Chiral-2” Methode**

Analyt	LLOQ (ng)	Linear Range (ng)	R <sup>2</sup>	Retentionszeit (rel. SD)	Auflösung R <sup>c</sup> (rel. SD)
5(R)-HETE	< 0.05	0.05 - 10	0.9909	22.03 (0.0)	5.7 (6.6)
5(S)-HETE	< 0.05		0.9872	23.47 (0.0)	
9(R)-HETE	0.10	0.25 - 25	0.9993	21.79 (0.1)	3.6 (10.7)
9(S)-HETE	0.10		0.9944	20.63 (0.1)	
11(R)-HETE	< 0.05	0.25 - 10	0.9974	21.51 (0.1)	6.4 (4.7)
11(S)-HETE	< 0.05		0.9995	23.02 (0.1)	
12(R)-HETE	< 0.05	0.05 - 10	0.9871	22.87 (0.0)	5.4 (3.3)
12(S)-HETE	< 0.05		0.9911	24.43 (0.1)	
15(R)-HETE	0.25	0.05 - 10	0.9872	22.02 (0.1)	8.8 (5.3)
15(S)-HETE	0.25		0.9909	24.54 (0.1)	
19(R)-HETE	0.25	0.25 - 10	0.9906	19.57 (0.1)	0.6 (18.5) <sup>d</sup>
19(S)-HETE	0.25		0.9899	19.41 (0.1)	
5(R)-HEPE	< 0.05	0.05 - 10	0.997	19.51 (0.1)	4.4 (4.0)
5(S)-HEPE	< 0.05		0.9907	20.59 (0.1)	
9(R)-HEPE	< 0.05	0.05 - 10	0.9933	19.19 (0.0)	3.9 (4.6)
9(S)-HEPE	< 0.05		0.9939	20.11 (0.1)	
12(R)-HEPE	0.25	0.25 - 25	0.9931	20.18 (0.1)	5.7 (14.8)
12(S)-HEPE	0.10		0.9893	21.61 (0.1)	
15(R)-HEPE	< 0.05	0.05 - 10	0.9929	19.38 (0.0)	4.9 (5.1)
15(S)-HEPE	< 0.05		0.9916	20.60 (0.1)	
18-HEPE peak 1	< 0.05	0.05 - 10	0.9925	18.43 (0.1)	3.0 (2.2)
18-HEPE peak 2	< 0.05		0.9929	19.14 (0.1)	
17(R)-HDHA	< 0.05	0.25 - 10	0.9993	21.85 (0.1)	4.9 (9.1)
17(S)-HDHA	< 0.05		0.9938	22.97 (0.1)	
11(R),12(S)-EET	< 0.05	0.5 - 10	0.9979	26.77 (0.0)	1.5 (7.7)
11(S),12(R)-EET	< 0.05		0.994	26.37 (0.1)	
11,12-EEQ peak 1	< 0.05	0.25 - 25	0.9994	23.55 (0.0)	0.7 (10.1) <sup>d</sup>
11,12-EEQ peak 2	< 0.05		0.9992	23.76 (0.1)	
7,8-EDP peak 1	< 0.05	0.25 - 10	0.9975	26.18 (0.0)	3.6 (5.0)
7,8-EDP peak 2	< 0.05		0.997	27.18 (0.1)	
13,14-EDP peak 1	< 0.05	0.25 - 10	0.9979	25.98 (0.0)	0.7 (9.6) <sup>d</sup>
13,14-EDP peak 2	< 0.05		0.9984	26.20 (0.1)	

a) ng absolut

b) Relative Standardabweichung (%) bezogen auf 9 QC-Proben bei drei verschiedenen Konzentrationen (QC 1-3)

c) 
$$R = 1,18 \cdot \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{FWHM_1 + FWHM_2} \right)$$
 ; Formel entsprechend Literatur .[126]

$t_R$ : Retentionszeit (min);  $FWHM$ : Full peak width at half maximum (min)

### 3.2.3.3 Akkuratess und Präzision

Tabelle 3-11 führt die Bestimmung von Akkuratess (Accuracy) und Präzision (Precision) der Chiralphasenanalytik auf. Die Messungen wurden für jeden Analyten bei drei unterschiedlichen Konzentrationen, die den kalibrierten Bereich abdecken (QC 1-3) jeweils mit zwei Wiederholungen innerhalb von 24 Stunden („intra-day“) durchgeführt.

Die Precision war als relative Standardabweichung der drei wiederholten Messungen definiert und sagt damit etwas über die Genauigkeit der Messungen aus. Den FDA-Kriterien entsprechend, gilt eine Precision von  $\leq 15\%$  Abweichung als akzeptabel für eine validierte Methode. Dieses Kriterium wurde für sämtliche Analyten bei allen drei Konzentrationen erreicht, in der Regel lag die Abweichung unter 10%.

Die Accuracy im herkömmlichen Sinne wurde in der vorliegenden Arbeit als „Accuracy I“ bezeichnet. Sie beschreibt die prozentuale Abweichung des Mittelwerts der Messwiederholungen vom Erwartungswert, der sich aus der Kalibrierfunktion des jeweiligen Analyten ergibt. Somit liefert die Accuracy eine Aussage über die Authentizität der Absolutwerte. Den FDA-Kriterien entsprechend, gilt eine Accuracy von  $\leq 20\%$  Abweichung als akzeptabel für die niedrigste Standardkonzentration nahe des LLOQs, und  $\leq 15\%$  Abweichung für höhere Konzentrationen. Im Rahmen dieser Validierung, wurde für QC 1 eine Abweichung von 20% in der Regel unterschritten, Ausnahmen bildeten 9(S)-HETE und 19(R)-HETE mit etwa 23% Abweichung. In der mittleren Analyten-Konzentration (QC 2) wurde eine Accuracy von 15% unterschritten (mit Ausnahme von 9(S)-HETE und 17(S)-HDHA mit etwa 16% Abweichung). Eine nicht befriedigende Accuracy wurde für hohe Konzentrationen (QC 3) der Monohydroxide festgestellt, hier lag die Abweichung bei 15 bis 27,5%. Die Schlussfolgerung ist, dass die Methode - angewendet am beschriebenen Messgerät - ausgehend von einer Kalibriergeraden authentische Absolutwerte liefert, sofern die Quantifizierung von Monohydroxiden nicht am oberen Limit der Kalibrierung erfolgt. Dieses Ergebnis kann als zufriedenstellend für den vorgesehenen Anwendungsbereich gesehen werden, da die fraglichen Monohydroxide biologisch oder klinisch kaum in Konzentrationsbereichen auftreten, wie sie den QC 3 - Messungen entsprechen.

Spezifisch zur Validierung der Chiralphasenanalytik, wurde als zusätzlicher Parameter eine „Accuracy II“ bestimmt. Entsprechend des Methodenaufbaus (vgl. Abbildung 3-23) wurden die Analyten auch in einem bereits etablierten achiralen System gemessen, sodass sich daraus Aussagen über die Authentizität der Absolutwerte der Chiralphasenanalytik verglichen mit herkömmlicher Eicosanoid-Analytik ableiten ließen.



**Tabelle 3-11 Accuracy und Precision**

Compound	QC 1			QC 2			QC 3		
	Prec <sup>1</sup>	Acc I <sup>2</sup>	Acc II <sup>3</sup>	Prec <sup>1</sup>	Acc I <sup>2</sup>	Acc II <sup>3</sup>	Prec <sup>1</sup>	Acc I <sup>2</sup>	Acc II <sup>3</sup>
5(R)-HETE	6.2	5.5	7.0	2.6	10.4	9.9	2.0	23.2	10.7
5(S)-HETE	8.2	0.8		1.9	6.3		0.7	27.5	
9(R)-HETE	6.6	17.5	16.6	4.2	10.9	14.2	2.3	0.1	0.0
9(S)-HETE	9.6	23.1		5.8	16.1		7.3	10.1	
11(R)-HETE	1.1	2.3	16.8	3.4	1.9	16.3	7.6	1.3	12.9
11(S)-HETE	0.9	7.6		4.4	8.5		3.9	5.2	
12(R)-HETE	8.9	1.4	4.8	3.4	5.5	1.4	1.6	24.7	12.4
12(S)-HETE	2.1	11.5		3.0	12.6		1.1	23.0	
15(R)-HETE	5.5	4.6	5.7	3.0	9.0	13.1	2.8	25.2	13.7
15(S)-HETE	4.3	5.5		2.8	14.3		0.6	24.6	
19(R)-HETE	12.5	22.5	16.2	4.6	9.2	18.3	3.7	3.7	4.7
19(S)-HETE	2.8	2.5		6.5	7.0		6.2	19.0	
5(R)-HEPE	6.6	8.8	10.7	2.8	4.2	10.2	2.2	24.4	8.8
5(S)-HEPE	3.4	9.1		2.9	7.3		3.0	19.9	
9(R)-HEPE	1.6	6.3	6.9	2.5	11.3	11.0	1.6	21.5	9.8
9(S)-HEPE	1.6	12.6		1.6	12.0		1.6	20.1	
12(R)-HEPE	6.3	0.5	0.1	11.9	7.5	15.9	2.3	6.7	1.1
12(S)-HEPE	1.3	7.6		7.6	8.3		11.1	1.3	
15(R)-HEPE	8.0	8.3	0.5	6.5	7.8	11.6	1.6	22.7	13.4
15(S)-HEPE	6.0	4.9		3.5	12.6		2.3	25.1	
18-HEPE peak 1	3.0	4.4	5.3	3.5	10.7	13.7	2.4	22.9	13.2
18-HEPE peak 2	6.8	15.3		2.9	14.3		3.4	26.3	
17(R)-HDHA	9.7	7.3	7.2	13.1	5.6	8.1	5.5	2.1	1.0
17(S)-HDHA	4.9	7.3		2.2	16.2		4.0	0.2	
8(R),9(S)-EET	6.0	6.2	13.6	2.7	8.4	10.5	6.3	11.2	12.6
8(S),9(R)-EET	8.6	1.6		4.0	3.3		6.5	9.4	
11(R),12(S)-EET	1.9	4.9	18.7	5.2	1.8	17.8	0.6	4.5	3.5
11(S),12(R)-EET	1.7	0.8		2.8	0.4		3.3	1.3	
14(R),15(S)-EET	4.7	6.7	10.7	4.1	5.8	11.1	6.5	10.7	14.5
14(S),15(R)-EET	6.4	9.6		5.8	4.8		5.3	14.1	
8,9-EEQ peak 1	7.3	7.1	3.9	4.5	4.3	11.4	6.2	15.1	15.0
8,9-EEQ peak 2	10.7	12.6		5.1	10.2		5.5	18.2	
11,12-EEQ peak	1.4	2.0	20.2	4.9	3.3	9.5	4.2	3.4	5.5
11,12-EEQ peak	1.8	3.9		2.7	1.9		2.9	3.0	
14,15-EEQ peak	7.4	3.9	17.2	3.0	5.3	2.0	7.5	15.9	15.9
14,15-EEQ peak	7.0	3.2		4.3	7.1		6.0	19.5	
17(R),18(S)-EEQ	4.7	5.6	12.1	4.1	7.9	4.5	6.4	8.9	8.4
17(S),18(R)-EEQ	7.3	4.4		5.7	10.8		6.1	10.4	
7,8-EDP peak 1	2.0	3.2	12.5	4.6	0.7	9.8	2.5	2.1	3.3
7,8-EDP peak 2	2.7	2.0		3.9	0.8		2.1	0.4	
13,14-EDP peak	1.8	1.6	21.5	5.4	0.8	4.6	0.7	1.3	0.8
13,14-EDP peak	1.2	4.5		2.2	6.3		8.3	1.1	
16,17-EDP peak	5.6	1.3	6.1	2.1	9.2	4.1	4.6	10.4	10.3
16,17-EDP peak	15.3	4.1		3.1	9.8		4.7	9.6	
19(R),20(S)-EDP	3.5	17.7	15.0	4.7	7.0	1.0	5.3	12.1	6.1
19(S),20(R)-EDP	6.4	8.1		8.1	4.0		4.6	17.7	

<sup>1</sup> Precision: Relative Standardabweichung (%), bezogen auf drei QC intra-day-Replikate

<sup>2</sup> Accuracy I: Prozentuale Abweichung des Mittelwerts von drei intra-day-gemessenen QC-Proben, bezogen auf den Erwartungswert entsprechend der Kalibriergeraden für diesen Analyten

<sup>3</sup> Accuracy II: Prozentuale Abweichung des Mittelwerts von drei intra-day-gemessenen QC-Proben, bezogen auf den Messwert im achiralen System.

Accuracy II beschreibt die prozentuale Abweichung der Summe der Mittelwerte korrespondierender Enantiomere bei drei Messwiederholungen vom Erwartungswert, der sich aus dem Messwert im achiralen System für das betreffende Enantiomeren-Paar ergibt. Für QC 1 lag sie bei weniger als 20%, mit Ausnahme von 11,12-EEQ (20,2%) und 13,14-EDP (21,5%); für QC 2 ebenfalls unter 20% und für QC 3 stets  $\leq 15\%$ , mit Ausnahme von 14,15-EEQ (15,9%).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bei Intraday-Messungen mit drei Messwiederholungen, für Analyten im Bereich der Kalibrierung eine gute Precision und gute Accuracy festgestellt wurden, mit Ausnahme einiger Monohydroxide bei Messung hoher Konzentrationen nahe des oberen Limits der Kalibrierung. Durch einen Vergleich der Absolutwerte korrespondierender Enantiomere mit Messdaten aus einem etablierten, achiralen System, konnte zudem die Authentizität und Übertragbarkeit von Messdaten der Chiralphasenanalytik beschrieben und für alle getesteten Analyten erfolgreich nachgewiesen werden.

### **3.2.3.4 Chromatografie in biologischen und klinischen Proben**

Die Bestimmung des Matrixeffekts war ein weiteres Kriterium einer Methodenvvalidierung, das insbesondere bei Messung von Analyten in biologischen und klinischen Proben wichtig erschien. In komplexer Matrix, die trotz sorgfältiger Extraktion der Probe stets noch teilweise im Messpräparat enthalten ist, kann bei ESI-MS-Analytik Ionensuppression auftreten. Gemeint ist damit eine ungleichmäßige Veränderung der Ionisierung von Analyten aufgrund von Matrixbestandteilen in Abhängigkeit von der Retentionszeit. Zudem beschreibt der Matrixeffekt die artifizielle Überlagerung von Messsignalen aus der Matrix mit MRMs des Analyten. Da die Kalibriergeraden für die Analyten in purem Lösungsmittel aufgenommen wurden, konnte der Matrixeffekt zu einer fehlerhaften Quantifizierung führen. Der Effekt wird bestimmt, indem Analyt definierter Menge dem Extrakt einer matrixreichen Probe zugegeben werden. Die bei der Messung erhaltene Peakfläche wird anschließend mit jener Peakfläche verglichen, die derselbe Analyt gemessen in purem Lösungsmittel erzielt. Die prozentuale Abweichung davon wird als Recovery angegeben und beschreibt indirekt den Matrixeffekt. Der Effekt ist individuell für jede einzelne Probe, jedoch kann eine Ähnlichkeit des Matrixeffekts etwa in Proben von Mauselebergewebe oder in Proben von humanem Plasma angenommen werden. Somit dienten jeweils sechs verschiedene Proben der genannten Gewebe als Bestimmungsgrundlage des Matrixeffekts. Da in diesen Proben generell endogene Vorkommen der fraglichen Analyten vorliegen, die eine Bestimmung der Recovery stören, wurde der Matrixeffekt anhand sechs verschiedener deuterierter Standards chiraler Analyten bestimmt, bei denen es sich um S-konfigurierte Enantiomere der Monohydroxide (5(S)-HETE-d8, 12(S)-HETE-d8, 15(S)-HETE-d8) und Racemate von Monoepoxiden (8,9-EET-d11, 11,12-EET-d11, 14,15-EET-d11) handelte. Eingesetzt wurden 5 ng je Standard auf Extrakte von 30 mg Gewebe bzw. 0,5 ml Plasma.

Tabelle 3-12 schlüsselt die beobachteten Matrixeffekte in Abhängigkeit von Matrix, Analyt und Chromatografie auf. Im achiralen System, das zu Vergleichszwecken geprüft wurde, trat in Mauslebergewebe ein moderater Matrixeffekt bei 12(S)-HETE-d8 auf (Recovery: 83,6%). In der Chiralphasenanalytik lag die Recovery in allen Fällen zwischen 90 und 115%, sodass festgehalten werden kann, dass in den Systemen Chiral-1 und Chiral-2 keine relevanten Matrixeffekte bei neun verschiedenen deuterierten Standards auftraten.

**Tabelle 3-12 Beschreibung der Matrixeffekte**

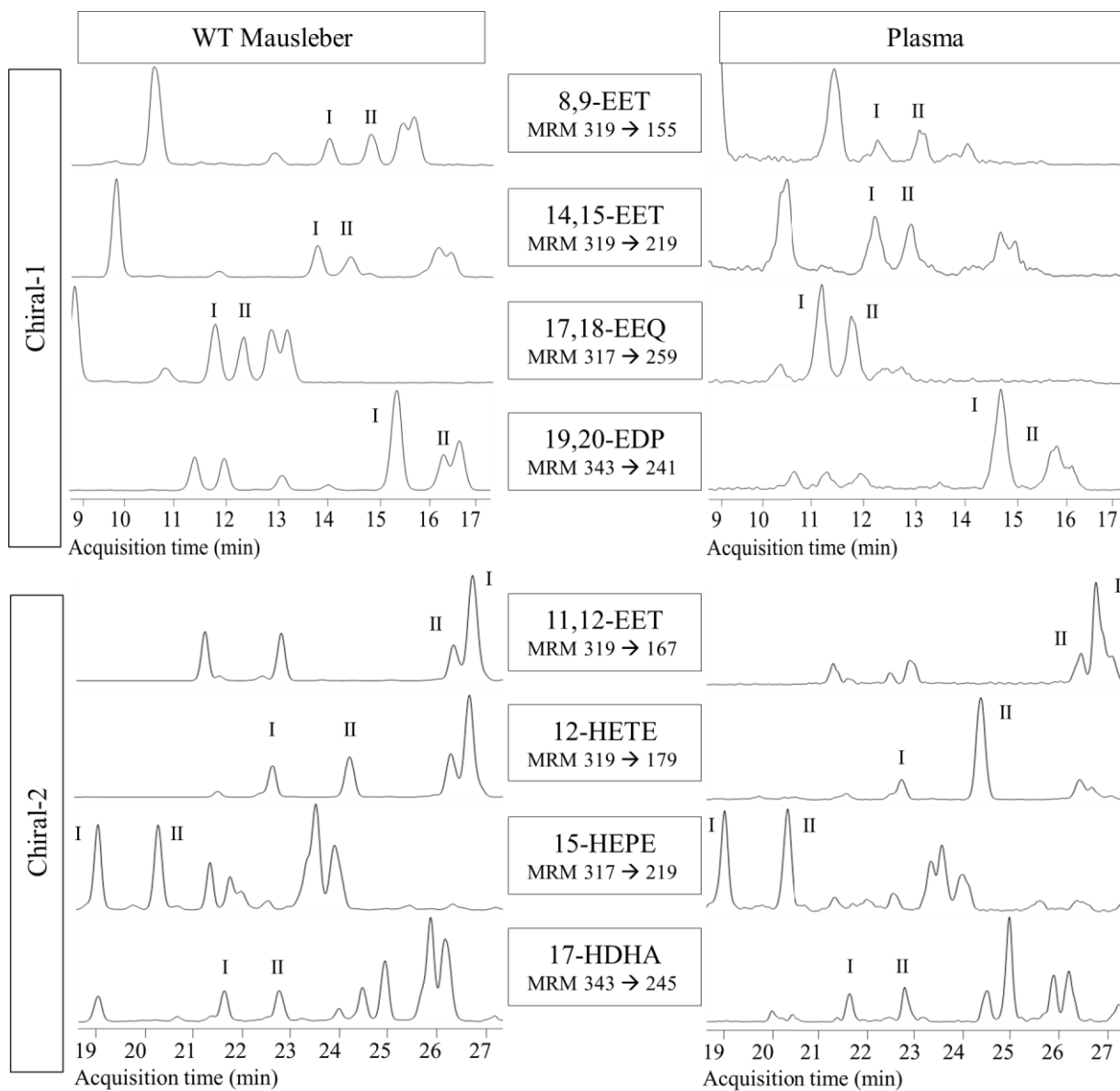
Analyt	Chiral-1			
	Murines Lebergewebe		Humanes Plasma	
	Recovery (%) <sup>1</sup>	RSD (%) <sup>2</sup>	Recovery (%) <sup>1</sup>	RSD (%) <sup>2</sup>
8(R),9(S)-EET-d11	106.0	11.0	105.5	7.1
8(S),9(R)-EET-d11	109.2	7.8	100.4	3.1
11,12-EET-d11	109.1	7.1	106.1	6.3
14(R),15(S)-EET-d11	105.1	6.5	114.0	5.3
14(S),15(R)-EET-d11	106.9	5.8	103.8	5.7
5(S)-HETE-d8	106.6	6.8	105.1	3.6
12(S)-HETE-d8	108.3	4.8	107.8	7.3
15(S)-HETE-d8	111.4	4.3	104.5	4.1
Analyt	Chiral-2			
	Murines Lebergewebe		Humanes Plasma	
	Recovery (%) <sup>1</sup>	RSD (%) <sup>2</sup>	Recovery (%) <sup>1</sup>	RSD (%) <sup>2</sup>
8(R),9(S)-EET-d11	103.2	5.2	97.7	4.4
8(S),9(R)-EET-d11	102.6	4.9	94.2	2.8
11(R),12(S)-EET-d11	108.1	5.3	98.4	9.4
11(S),12(R)-EET-d11	104.1	4.2	97.8	2.1
14(R),15(S)-EET-d11	97.8	9.6	96.8	5.4
14(S),15(R)-EET-d11	103.2	5.1	98.6	4.3
5(S)-HETE-d8	102.1	3.8	98.6	4.1
12(S)-HETE-d8	103.9	3.8	99.1	2.3
15(S)-HETE-d8	100.6	3.8	94.0	1.0
Analyt	Achiral			
	Murines Lebergewebe		Humanes Plasma	
	Recovery (%) <sup>1</sup>	RSD (%) <sup>2</sup>	Recovery (%) <sup>1</sup>	RSD (%) <sup>2</sup>
8,9-EET-d11	90.4	6.6	92.8	4.7
11,12-EET-d11	90.0	4.8	94.7	4.5
14,15-EET-d11	105.8	6.5	105.1	4.6
5(S)-HETE-d8	101.1	3.3	93.9	4.3
12(S)-HETE-d8	83.4	12.9	92.5	8.5
15(S)-HETE-d8	98.5	16.7	105.3	6.4

<sup>1</sup> Recovery ausgedrückt als das Verhältnis der mittleren Peakfläche deuterierter Standards, die nach Extraktion des Gewebes zugesetzt wurden, und deren mittlere Peakfläche in purem Lösungsmittel (n=6).

<sup>2</sup> Relative Standardabweichung (%) bezogen auf 6 Replikate identischer Konzentration

Abbildung 3-22 illustriert anhand von jeweils vier Beispielen der Chiral-1- und Chiral-2-Analytik die real anzutreffenden Verhältnisse der MRM-Aufzeichnung für endogene Analyt-Vorkommen in Extrakten aus biologischen und klinischen Proben. Auch unter diesen Bedingungen konnte eine hervorragende Trennung und Bestimmung der einzelnen Enantiomere erreicht werden. Bei 19(*S*),20(*R*)-EDP trat ein dicht gelagerter, artifizieller Peak auf. Durch stabile Retentionszeiten, gute Sensitivität der Analytik und Prüfung der Authentizität der Peaks anhand der jeweiligen Qualifier-MRMs (vgl. Tabelle 3-7) konnte jedoch auch hier eine sichere Zuordnung und Quantifizierung des Analyten ermöglicht werden. Die Messung einer Standard-Mixtur der Analyten erfolgte zur Absicherung nach jeweils 10 gemessenen biologischen oder klinischen Proben, zudem wurden die von der Mass Hunter-Software automatisiert bestimmten und integrierten Peaks stets manuell geprüft und nötigenfalls korrigiert. Erkennbar ist in Abbildung 3-22 ferner, dass im System Chiral-1 etwas breitere Peaks auftreten als in Chiral-2, was auf die Verwendung von Methanol als Organikkomponente im Laufmittel zurückzuführen ist. Mit Acetonitril als organisches Laufmittel wurde jedoch keine geeignete Chromatografie zur chiralen Auflösung der endständigen Monoepoxide gefunden (vgl. Abbildung 3-18), weshalb die Verwendung von Methanol in diesem Fall als bestmögliche Variante eingeschätzt wurde, die noch ausreichend gute MRM-Chromatogramme lieferte, wie aus Abbildung 3-22 deutlich hervorgeht.

Insgesamt gelang es mit der vorliegenden Arbeit, mittels LC-ESI-MS/MS erstmalig eine Chiralphasenanalytik zu etablieren, die die Bestimmung und Quantifizierung von 48 Enantiomeren der Monohydroxide und Monoepoxide nicht nur unter Idealbedingungen gewährleistet, sondern auch eine Bestimmung dieser chiralen Analyten in sehr geringen, endogenen Konzentration eingebettet in komplexe Matrix wie Lebergewebe oder Plasma ermöglicht. Gleichzeitig wurde mit Gradientenlaufzeiten von maximal 30 Minuten die Voraussetzung für eine wirtschaftliche Routineanwendung geschaffen. Das Verfahren wurde zahlreichen Validierungskriterien unterzogen und bewies dabei seine Authentizität und Reproduzierbarkeit.



**Abbildung 3-22 Repräsentative Chirale LC-ESI-MS/MS Chromatogramme**

Dargestellt sind Beispiele der enantiomeren Auflösung von endogenen monohydroxy- und monoepoxy-Analyten in Extrakten für die Analyse biologischer Proben. Die Analyse erfolgte mittels der Methoden „Chiral-1“ und „Chiral-2“ entsprechend der individuellen Bedingungen, die für die jeweiligen Analyten optimiert wurden (vgl- Tabellen 3-4 bis 3-9). Die Extraktion der Proben erfolgte entsprechend Abschnitt 2.1.4. Markiert sind jeweils das (R)/(R,S)-Enantiomer ( I ) und das (S)/(S,R)-Enantiomer ( II).

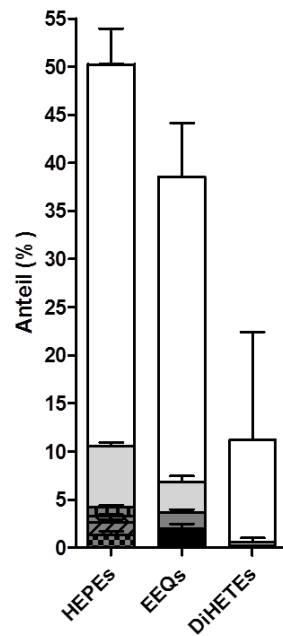
### **3.3 Anwendung der Chiralphasen-Analytik auf biologische Fragestellungen**

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die Eignung der etablierten Chiralphasen-Analytik für die Lösung biologischer Fragestellungen anhand von Anwendungsbeispielen zu prüfen. Im Einzelnen sollte dazu einerseits die stereoselektive Bildung von 17,18-EEQ und 18-HEPE durch CYP1A1 analysiert werden (Abschnitt 3.3.1). Ein Schwerpunkt lag in der Beschreibung der Stereoselektivität der löslichen wie auch mikrosomalen Epoxid-Hydrolase (Abschnitt 3.3.2) und der Beitrag der sEH zum endogenen Enantiomerenprofil von Monoepoxiden anhand eines sEH-Knockout-Mausmodells (Abschnitt 3.3.4). Weiterhin sollte die Bedeutung von CYP-mEH-Interaktionen erforscht werden (Abschnitt 3.3.3). Zudem wurde ein Profil der enantiomeren Monoepoxid- und Monohydroxidvorkommen in humanem Plasma erstellt und die chiralen Auswirkungen einer Calcium-Ionophor-Stimulation des Vollblutes untersucht (Abschnitt 3.3.5). In die jeweiligen Arbeiten wurde eine Qualitätskontrolle der etablierten chiralen Analytik mit einbezogen, welche die Validität der Methodik prüfen sollte.

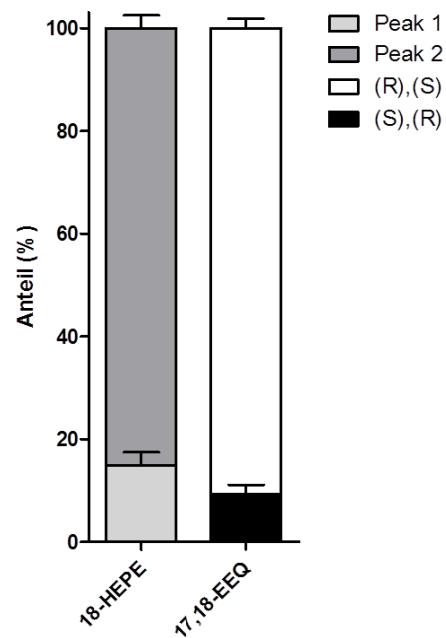
#### **3.3.1 Stereoselektive Bildung von 17,18-EEQ und 18-HEPE durch CYP 1A1**

Eine erste Anwendung der Chiralphasen-Analytik auf biologische Fragestellungen war in Zusammenarbeit mit Mirjam Karber (Doktorandin am BIH) die Untersuchung der Stereoselektivität von CYP1A1, das sowohl als Monohydroxylase als auch Monoepoxygenase aktiv ist. Zwei Produkte standen dabei im Vordergrund der Analytik. Bereits aus der Literatur ist bekannt [118], dass das Enzym hochgradig stereoselektiv für die Bildung von 17(*R*),18(*S*)-EEQ ist. Die Bestätigung dieses Befunds geht aus Abbildung 3-23 hervor und ist ein Beleg für die Reproduzierbarkeit chiraler Ergebnisse früherer Studien durch die vorliegend etablierte Chiralphasen-Analytik. Die spezifische Bildung dieses Enantiomers ist von biologischer Bedeutung, wie die Regulation der Schlagfrequenz in neonatalen Rattenkardiomyozyten enantiospezifisch durch 17(*R*),18(*S*)-EEQ aufzeigt [127]. Der zweite Analyt von besonderem Interesse stellte 18-HEPE dar. Dieses Monohydroxid ist als Precursor der E-Resolvine beschrieben, und bezüglich seiner Bildung blieb bisher die Frage offen, ob es durch humane CYPs enzymatisch gebildet wird. Wie aus Abbildung 3-23 hervorgeht, wird 18-HEPE durch CYP1A1 in erheblichem Umfang am Gesamtprodukt und auch stereoselektiv gebildet, womit das Enzym als ein möglicher CYP-abhängiger Precursor für humane Vorkommen von 18-HEPE gelten kann.

A



B

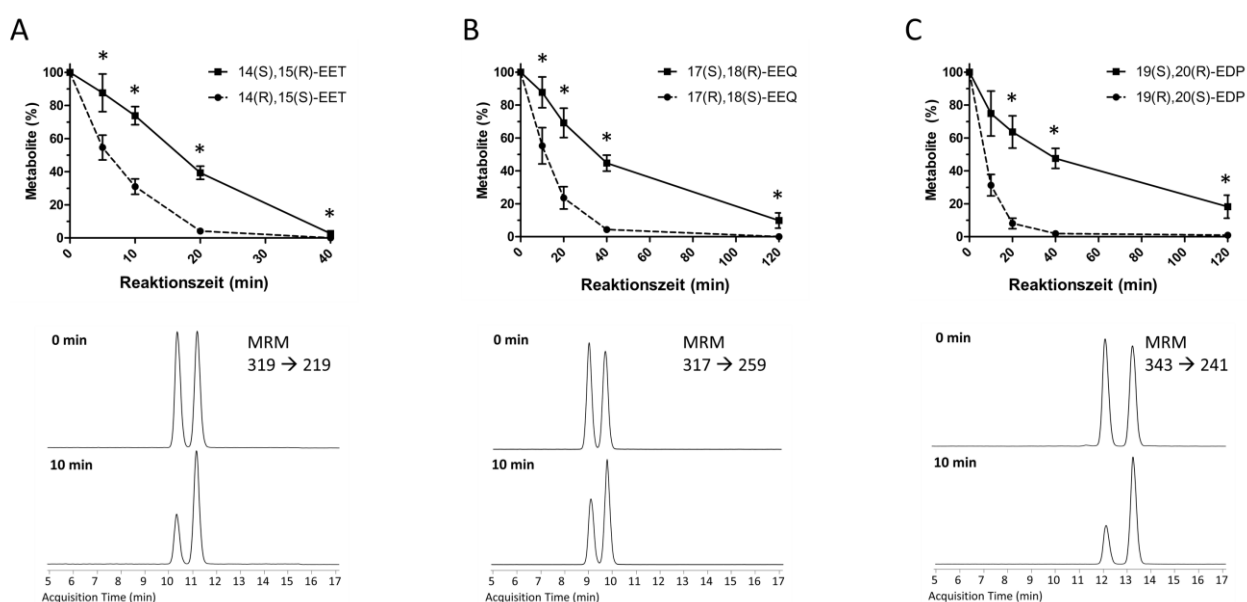


### Abbildung 3-23 Stereoselektive Bildung von 17,18-EEQ und 18-HEPE durch humanes CYP1A1

Dargestellt sind die Resultate aus Inkubation von 100  $\mu\text{M}$  EPA in Gegenwart von 1 mM NADPH und 0,25  $\mu\text{M}$  rekombinant exprimiertem CYP1A1 über 20 min. A) Achirale LC-MS/MS-Analyse des Produktmusters von CYP1A1. Das Gesamtprodukt bezieht sich auf die Summe aus EEQs, DiHETEs und HEPEs, abzüglich der Werte aus Nicht-Enzym-Kontrollen. B) Chirale LC-MS/MS-Analyse der Stereoselektivität von CYP1A1 in Bezug auf 18-HEPE und 17,18-EEQ. Das Gesamtprodukt bezieht sich auf die Summe aus den Enantiomeren von jeweils 18-HEPE und 17,18-EEQ. Die Daten sind gezeigt als Mittelwerte ( $n=3-4$ )  $\pm$  SD.

### 3.3.2 Stereospezifitäten der löslichen und mikrosomalen Epoxid-Hydrolase

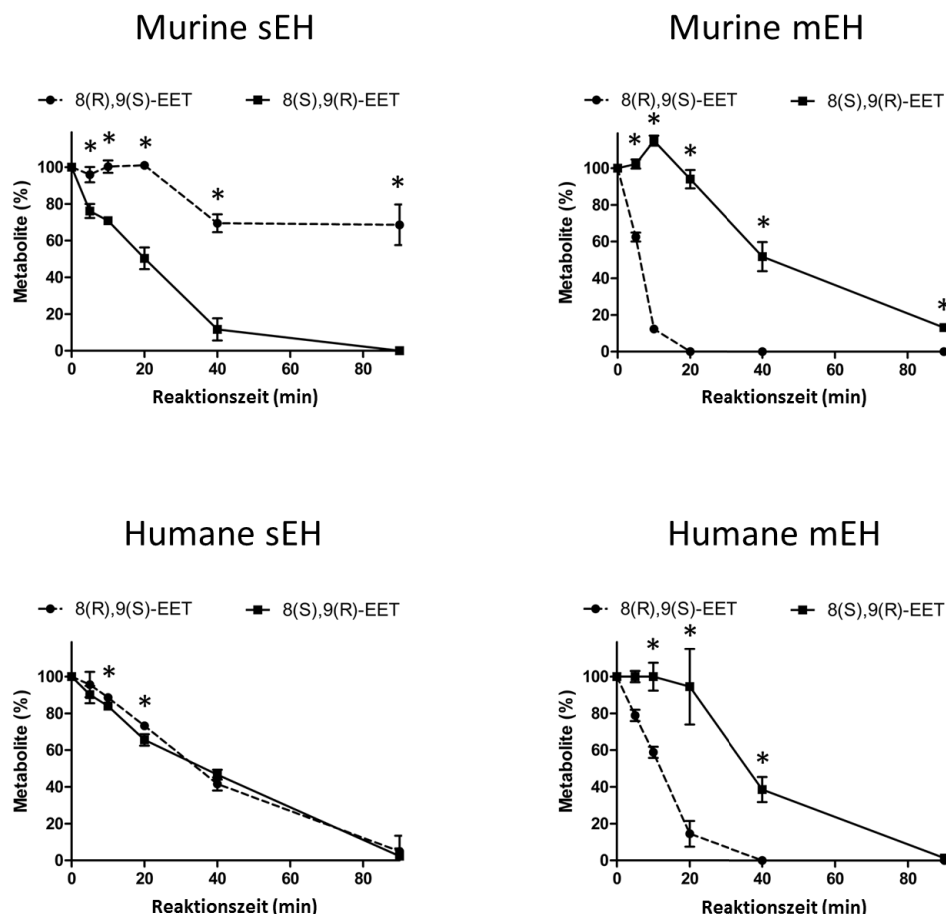
Die Stereospezifität der sEH wurde in Bezug auf EETs bereits in der Vergangenheit gezeigt [128]. Die chirale Analyse einzelner Monoepoxide aus *in vitro* – Versuchen war seinerzeit mittels chiraler Normalphasen-Chromatografie und UV-Detektion möglich. Mit der neuen, in der vorliegenden Arbeit etablierten Chiralphasenanalytik wurde daher zunächst die Reproduzierbarkeit der bereits beschriebenen Stereospezifität der sEH überprüft. Der Abbau von 14,15-EET wurde dabei in einem Gemisch mit 17,18-EEQ und 19,20-EDP in Gegenwart muriner sEH untersucht. Abbildung 3-24 zeigt den Zeitverlauf der Hydrolyse, sowie ausgewählte Chromatogramme. Die literaturseitig beschriebene Präferenz für das (*R,S*)-Enantiomer von 14,15-EET bestätigte sich, wobei das (*S,R*)-Enantiomer zeitlich verzögert ebenfalls abgebaut wurde. Dieselbe Enantiospezifität ergab sich mit 17,18-EEQ und 19,20-EDP, wobei die 7-fache Menge cytosolischer Fraktion eingesetzt werden musste, um eine Hydrolyse im gleichen Zeitraum zu erreichen.



**Abbildung 3-24 Zeitverlauf der enantioselektiven Hydrolyse von 14,15-EET, 17,18-EEQ und 19,20-EDP durch murine sEH**

Jeweils 10 µM der drei Racemate wurden mit unterschiedlicher Menge cytosolischer Fraktion aus WT-Mäusen inkubiert (vgl. Abschnitt 2.2.2). Der Zeitverlauf beschreibt den rapiden Abbau von 14,15-EET in Gegenwart von 16 µg/ml cytosolischer Fraktion (A), sowie den deutlich langsameren Abbau von 17,18-EEQ (B) und 19,20-EDP (C) in Gegenwart von 112 µg/ml cytosolischer Fraktion. Zu den markierten Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben abgenommen, extrahiert und mittels der Chiral-I-Methode analysiert. Die unteren Abbildungen zeigen repräsentative LC-ESI-MS/MS-Chromatogramme, jeweils vor Reaktionsstart durch sEH-Zugabe, und 10 min danach. In den oberen Diagrammen ist auf der Y-Achse die prozentuale Menge noch vorhandenen Substrats aufgetragen, auf der X-Achse der Zeitverlauf der Inkubation. Die Daten sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Inkubationen ± SD gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede korrespondierender Enantiomere sind dargestellt mit \* ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test). Die nichtenzymatische Hydrolyse in Puffer-Kontrollen betrug weniger als 5% (nicht dargestellt).

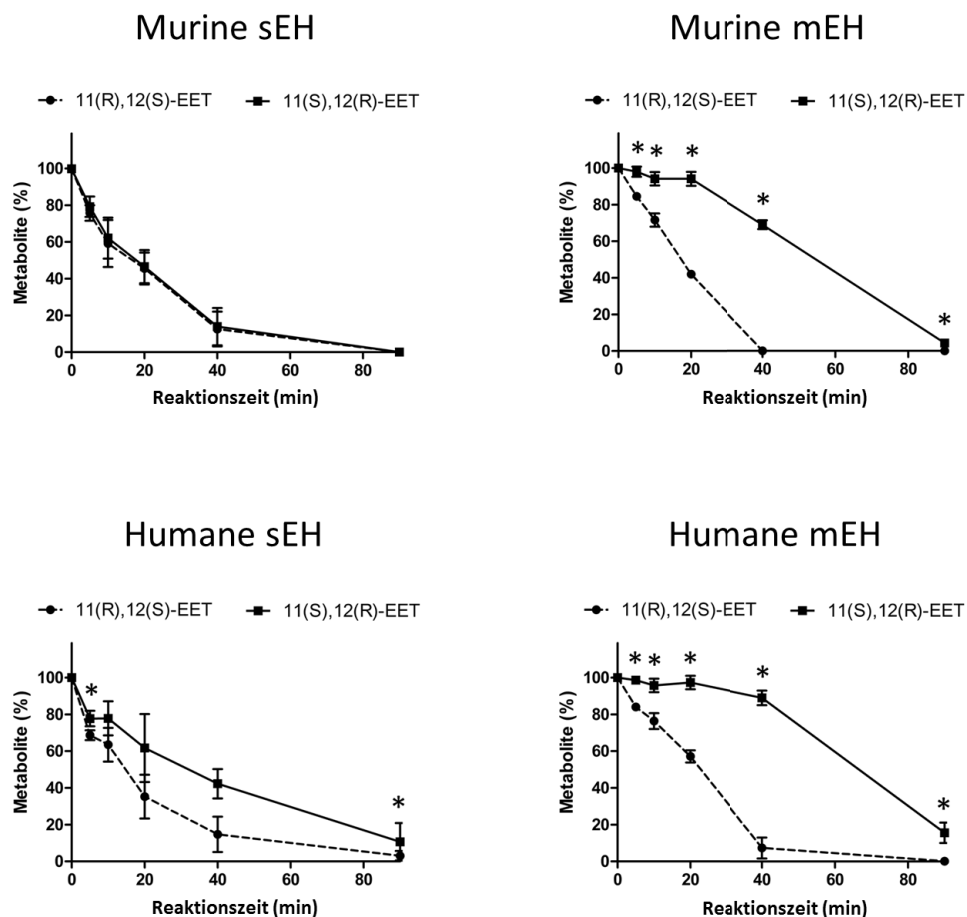




**Abbildung 3-25 Enantioselektive Hydrolyse von 8,9-EET durch sEH und mEH**

8,9-EET (10  $\mu$ M) wurde mit unterschiedlichen Epoxid-Hydrolasen inkubiert. Für die Zeitverläufe der murinen sEH wurde cytosolische Fraktion aus WT-Mäusen (7  $\mu$ g/ml), für murine mEH Lebermikrosomen von sEH-KO-Mäusen (800  $\mu$ g/ml), für humane sEH rekombinante humane sEH (0,4  $\mu$ g/ml) und für humane mEH humane Lebermikrosomen (400  $\mu$ g/ml) in Gegenwart von TPPU (2  $\mu$ M) eingesetzt. Zu den markierten Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben abgenommen, extrahiert und mittels der chiralen LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Inkubationen  $\pm$  SD gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede korrespondierender Enantiomere sind dargestellt mit \* ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

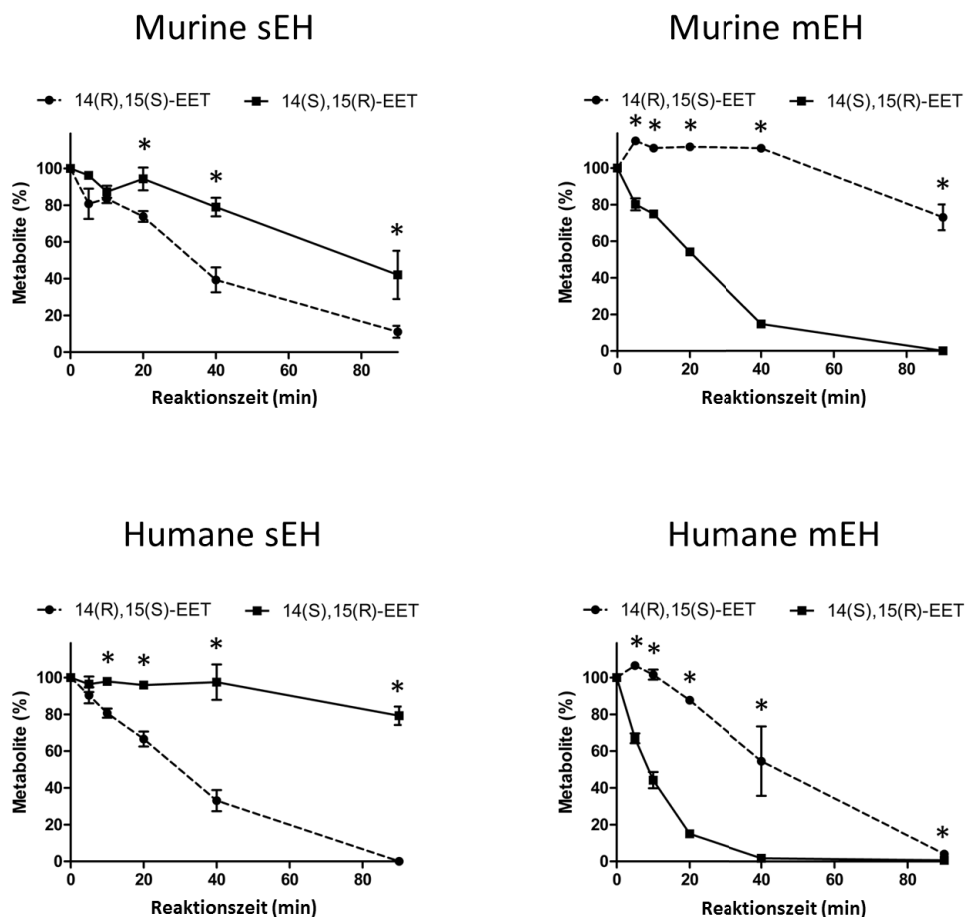
Weitere Untersuchungen der Stereospezifität erfolgten mit dem Fokus auf potentielle Unterschiede zwischen sEH und mEH. In die Betrachtung wurden sowohl murine als auch humane Enzyme einbezogen. Zur Charakterisierung der mEH wurden murine Lebermikrosomen aus sEH-KO-Mäusen verwendet, während humane Lebermikrosomen in Gegenwart eines starken sEH-Inhibitors TPPU (2  $\mu$ M) eingesetzt wurden. Zum Vergleich dienten humane rekombinante sEH, sowie murine, cytosolische Leberfraktion. Als Substrate wurden racemisches 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EEQ und 19,20-EDP eingesetzt, die separat mit den jeweiligen Epoxid-Hydrolase inkubiert wurden.



**Abbildung 3-26 Enantioselektive Hydrolyse von 11,12-EET durch sEH und mEH**

11,12-EET (10  $\mu$ M) wurde mit unterschiedlichen Epoxid-Hydrolasen inkubiert. Für die Zeitverläufe der murinen sEH wurde cytosolische Fraktion aus WT-Mäusen (7  $\mu$ g/ml), für murine mEH Lebermikrosomen von sEH-KO-Mäusen (800  $\mu$ g/ml), für humane sEH rekombinante humane sEH (0,4  $\mu$ g/ml) und für humane mEH humane Lebermikrosomen (200  $\mu$ g/ml) in Gegenwart von TPPU (2 $\mu$ M) eingesetzt. Zu den markierten Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben abgenommen, extrahiert und mittels der chiralen LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Inkubationen  $\pm$  SD gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede korrespondierender Enantiomere sind dargestellt mit \* ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

Abbildung 3-25 zeigt die Enantiospezifität im Zeitverlauf sowohl muriner als auch humaner sEH und mEH für racemisches 8,9-EET als Substrat. Die Zeitverläufe für die racemischen Substrate von 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EEQ und 19,20-EDP sind in den Abbildungen 3-26 bis 3-29 dargestellt. Erkennbar wird daran das jeweilige Ausmaß aufgetretener Stereoselektivität. Tabelle 3-13 gibt eine Übersicht über die festgestellten Enantiospezifitäten der verschiedenen Epoxid-Hydrolasen in Abhängigkeit vom Substrat. Die Enantiospezifitäten der mEH wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben, sie weichen in Bezug auf die getesteten Substrate stets deutlich von den Spezifitäten der sEH ab, und sind oft sogar diametral verschieden. Teilweise traten auch Unterschiede zwischen muriner und humaner mEH beziehungsweise sEH auf, diese waren jedoch nicht diametral.



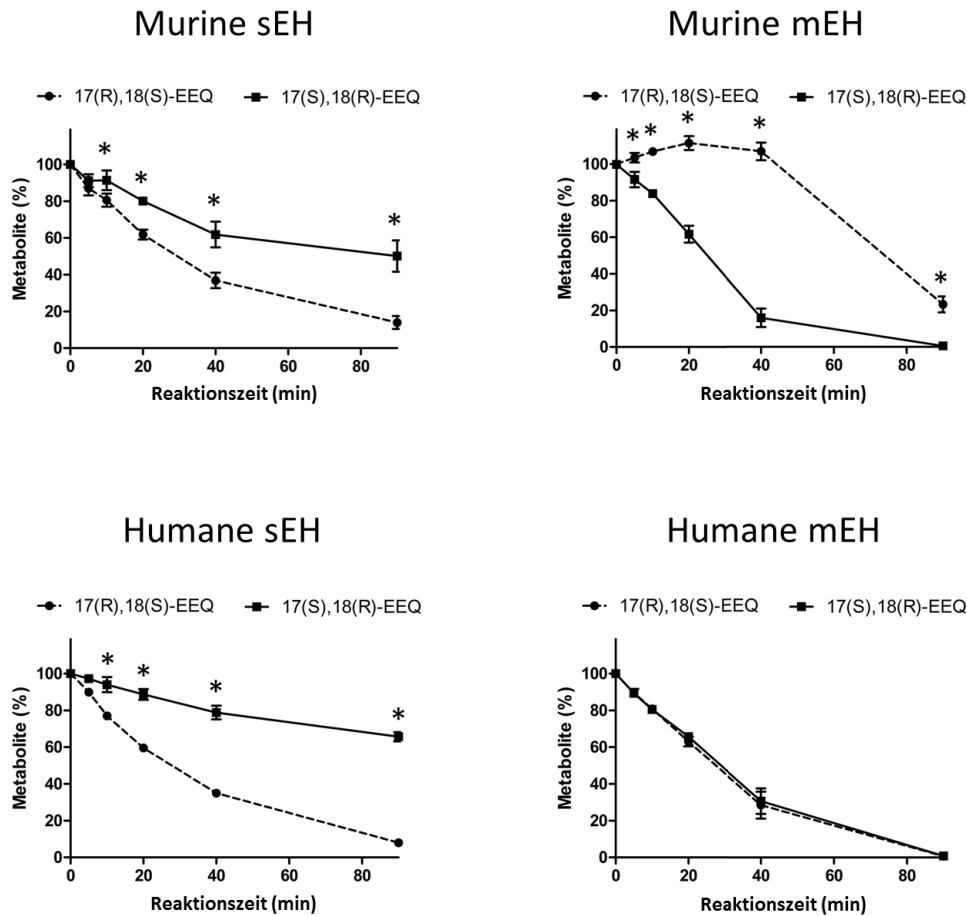
**Abbildung 3-27 Enantioselektive Hydrolyse von 14,15-EET durch sEH und mEH**

14,15-EET (10  $\mu$ M) wurde mit unterschiedlichen Epoxid-Hydrolasen inkubiert. Für die Zeitverläufe der murinen sEH wurde cytosolische Fraktion aus WT-Mäusen (1  $\mu$ g/ml), für murine mEH Lebermikrosomen von sEH-KO-Mäusen (1600  $\mu$ g/ml), für humane sEH rekombinante humane sEH (0,03  $\mu$ g/ml) und für humane mEH humane Lebermikrosomen (400  $\mu$ g/ml) in Gegenwart von TPPU (2 $\mu$ M) eingesetzt. Zu den markierten Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben abgenommen, extrahiert und mittels der chiralen LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Inkubationen  $\pm$  SD gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede korrespondierender Enantiomere sind dargestellt mit \* ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

**Tabelle 3-13 Enantiospezifitäten muriner und humaner mEH und sEH in Bezug auf Racemate der CYP-Monoepoxide <sup>1</sup>**

	murine sEH	humane sEH	murine mEH	humane mEH
8,9-EET	(S),(R)	k.S.	(R),(S)	(R),(S)
11,12-EET	k.S	k.S	(R),(S)	(R),(S)
14,15-EET	(R),(S)	(R),(S)	(S),(R)	(S),(R)
17,18-EEQ	(R),(S)	(R),(S)	(S),(R)	k.S
19,20-EDP	(R),(S)	(R),(S)	(S),(R)	k.S

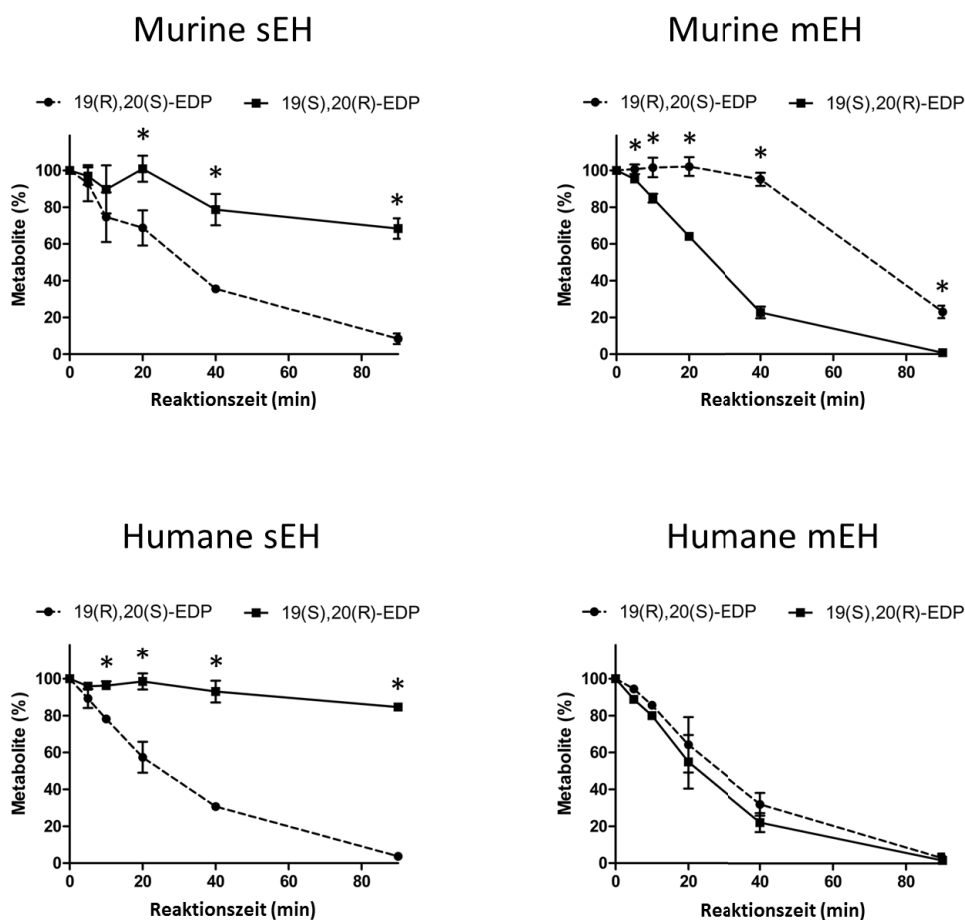
<sup>1</sup> Dargestellt ist das vom jeweiligen Enzym bevorzugte Enantiomer; k.S = keine signifikante Enantiospezifität



**Abbildung 3-28 Enantioselective Hydrolyse von 17,18-EEQ durch sEH und mEH**

17,18-EET (10  $\mu$ M) wurde mit unterschiedlichen Epoxid-Hydrolasen inkubiert. Für die Zeitverläufe der murinen sEH wurde cytosolische Fraktion aus WT-Mäusen (10  $\mu$ g/ml), für murine mEH Lebermikrosomen von sEH-KO-Mäusen (1600  $\mu$ g/ml), für humane sEH rekombinante humane sEH (0,2  $\mu$ g/ml) und für humane mEH humane Lebermikrosomen (200  $\mu$ g/ml) in Gegenwart von TPPU (2 $\mu$ M) eingesetzt. Zu den markierten Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben abgenommen, extrahiert und mittels der chiralen LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Inkubationen  $\pm$  SD gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede korrespondierender Enantiomere sind dargestellt mit \* ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

Deutlich wurden nicht nur die gegensätzliche stereoselektive Präferenz, sondern auch die völlig unterschiedlichen Regiospezifitäten löslicher und mikrosomaler Epoxid-Hydrolasen. So war für 14,15-EET die benötigte Menge sEH nahezu 10fach geringer als bei Inkubationen mit 8,9- und 11,12-EET. Auch bei 17,18-EEQ und 19,20-EDP, wo von muriner, vor allem aber der humanen sEH das (R,S)-Enantiomer bevorzugt abgebaut wird, lag eine etwa 10fach geringerer Aktivität als mit 14(R),15(S)-EET vor. Murine, mikrosomale Fraktionen mit mEH mussten im Vergleich zu cytosolischen Fraktionen mit sEH in der 10 bis 100fachen Proteinmenge eingesetzt werden, um im Zeitverlauf von 90 min jeweils einen weitgehenden Abbau des Substrates zu erreichen.



**Abbildung 3-29 Enantioselektive Hydrolyse von 19,20-EDP durch sEH und mEH**

19,20-EET (10  $\mu$ M) wurde mit unterschiedlichen Epoxid-Hydrolasen inkubiert. Für die Zeitverläufe der murinen sEH wurde cytosolische Fraktion aus WT-Mäusen (10  $\mu$ g/ml), für murine mEH Lebermikrosomen von sEH-KO-Mäusen (800  $\mu$ g/ml), für humane sEH rekombinante humane sEH (0,2  $\mu$ g/ml) und für humane mEH humane Lebermikrosomen (100  $\mu$ g/ml) in Gegenwart von TPPU (2 $\mu$ M) eingesetzt. Zu den markierten Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben abgenommen, extrahiert und mittels der chiralen LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Inkubationen  $\pm$  SD gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede korrespondierender Enantiomere sind dargestellt mit \* ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

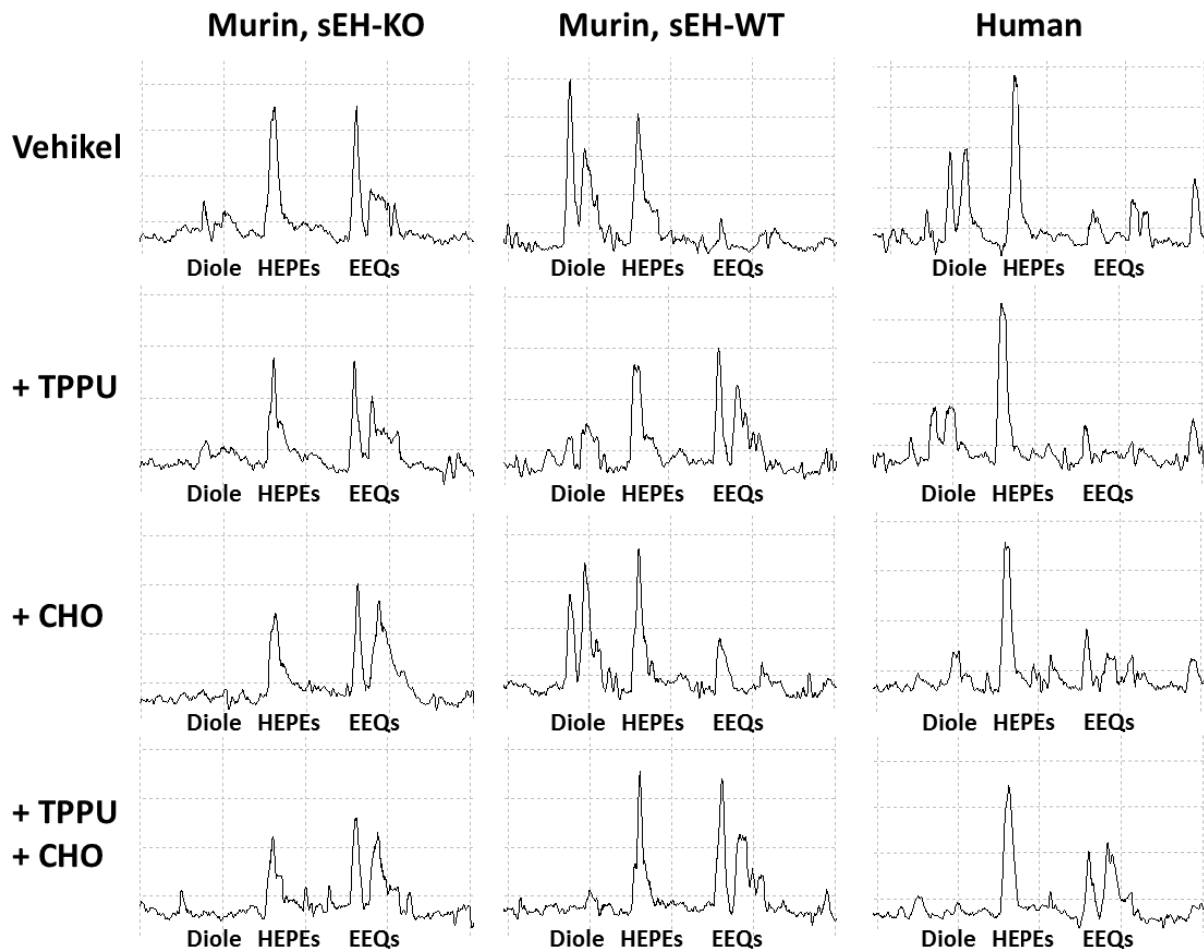
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bei allen untersuchten Substraten deutlich gegensätzliche Enantiospezifitäten von sEH und mEH auftraten, zudem fiel die Regiospezifität sehr unterschiedlich aus. Die biologische Bedeutung beider Hydrolasen ist demnach stark verschieden, und die mEH wird bei der Interpretation sowohl chiraler als auch achiraler Messdaten von Monoepoxiden stärker Berücksichtigung finden müssen als bisher angenommen. Teilweise wirkt sich den vorliegenden *in vitro*-Daten zufolge die Aktivität von mEH und auch sEH in Mäusen anders aus als im Menschen, was auch bei *in vivo*-Analysen in Tiermodellen für den Menschen berücksichtigt werden muss.

### **3.3.3 CYP-mEH-Interaktion und die Stereospezifität der mikrosomalen Bildung von Monoepoxiden**

Die spezifische Aktivität mikrosomaler Epoxid-Hydrolase ist um mehrere Größenordnungen niedriger als jene der löslichen Epoxid-Hydrolase. Es wurde daher angenommen, dass die biologische Rolle der mEH in Bezug auf die PUFA-Epoxide, nicht sehr relevant ist. Das Substrat war in den betreffenden Versuchen exogener Herkunft. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten [34] beschreiben jedoch eine physische Assoziation von mEH mit Epoxid-bildenden CYPs in Membransystemen, sodass die Zugänglichkeit der mEH zum Substrat unter physiologischen Bedingungen erleichtert sein dürfte. Unter Annahme dieser These, sollte eine mEH-Abhängigkeit der Stereoselektivität bei Inkubationen mit Gewebsmikrosomen erkennbar sein. Dazu wurden NADPH-abhängige Inkubationen von AA und EPA mit verschiedenen murinen und humanen Lebermikrosomen durchgeführt, wobei auch die Aktivität von sEH durch TPPU und von mEH durch Cyclohexenoxid (CHO) unterdrückt wurde.

Zunächst erfolgten Messungen mit  $^{14}\text{C}$ -markierter EPA, um die tatsächlich neu gebildete Produkte zu messen und die Wirksamkeit und Spezifität der Inhibitoren zu prüfen. Wie aus Abbildung 3-30 hervorgeht, trat in Mikrosomen aus Lebern von sEH-KO-Tieren eine erhebliche Diolbildung ein, die von TPPU unbeeinflusst blieb und erst in Gegenwart von CHO unterdrückt wurde. Die CYP-Aktivität wurde durch die Inhibitoren nicht wesentlich beeinträchtigt, sowohl die Menge gebildeter Monohydroxide wie auch die Summe aus Diolen und Epoxiden blieben etwa konstant. Bei Inkubation von entsprechenden WT-Mikrosomen zeigte sich ebenso, dass erst in Kombination von TPPU und CHO eine vollständige Unterdrückung der Diolbildung eintrat, wobei die vorhandene sEH-Aktivität durch Verunreinigungen der Mikrosomen mit Zellüberstand zu erklären ist (vgl. Abschnitt 2.1.2). Bei Inkubation mit humanen Lebermikrosomen ergab sich ein sehr ähnliches Bild, in allen Fällen wurde die Diolbildung in Gegenwart beider Inhibitoren um mindestens 90% reduziert und die Menge gebildeter EEQs stark vergrößert. Daraus lässt sich schließen, dass geeignete Inhibitor-Dosen gefunden wurden, um die Diolbildung nahezu vollständig und spezifisch zu unterdrücken, ohne die CYP-Aktivität relevant zu beeinträchtigen. Zudem ergab sich, dass nicht nur sEH, sondern auch mEH einen erheblichen Einfluss auf das Epoxidprofil in mikrosomalen Inkubationen hat, was auf eine mögliche Bedeutung der mEH auch *in vivo* hindeutet.

Die These wurde weiterhin mittels der Chiralphasen-Analytik geprüft. Demnach wäre zu erwarten, dass eine Inhibition der mEH in Gewebsmikrosomen Auswirkungen auf die Enantiomeren-Verteilung hat, entsprechend der in Abschnitt 3.3.2 gefundenen stereospezifischen Präferenzen. Hierzu wurde nicht radioaktiv markierte AA als Substrat ausgewählt.



**Abbildung 3-30 Hemmung der Diolbildung durch TPPU und CHO in Lebermikrosomen**

$^{14}\text{C}$ -EPA (10  $\mu\text{M}$ ) wurde mit je 80  $\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{l}$  humanen- sowie murinen Lebermikrosomen von sEH-KO oder WT-Tieren inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH (1mM) gestartet und nach 5 min bei 37°C mit Zitronensäure (20 mM) gestoppt. Wahlweise erfolgte die Reaktion in Gegenwart des sEH-Inhibitors TPPU (2  $\mu\text{M}$ ) und/oder mit mEH-Inhibitor CHO (250  $\mu\text{M}$  für murine, 800  $\mu\text{M}$  für humane Lebermikrosomen). In Kombination beider Inhibitoren wurde eine nahezu vollständige Unterdrückung der Diolbildung erreicht. Die Vehikelkontrolle enthielt 0,025% Ethanol und 0,04% DMSO. Die Messung erfolgte mittels RP-HPLC und radioflow-Detektion (Berthold Technologies). Die Chromatogramme bilden die gemessene Radioaktivität (Y-Achse) gegen die Zeit (X-Achse) ab.

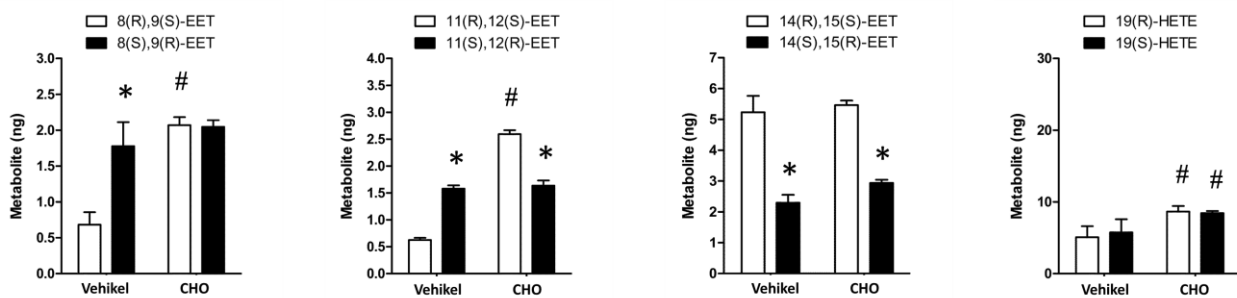
Abbildung 3-31 veranschaulicht, wie sich die Verteilung der mittels CYPs aus AA gebildeten Stereoisomere in Abhängigkeit der mEH-Aktivität in Lebermikrosomen verändert. Primäre Hauptprodukte waren die EETs sowie 19-HETE. Die CHO-abhängige mEH-Inhibition führte zu einer deutlichen Verschiebung der Enantiomerenverteilung der Monoepoxide und eine Erhöhung der Epoxid-Level insgesamt. In murinen Lebermikrosomen vergrößerte sich beispielsweise das Level von 11(*R*),12(*S*)-EET um das 4fache, verglichen mit der Vehikelkontrolle. In humanen Lebermikrosomen war ein 6facher Anstieg der 14(*S*),15(*R*)-EET-Level der deutlichste Effekt. Die spezifisch erhöhten

Level der Enantiomere stimmen mit den Befunden aus mEH-Versuchen mit exogen zugegebenen Epoxiden (Abschnitt 3.3.2) überein.

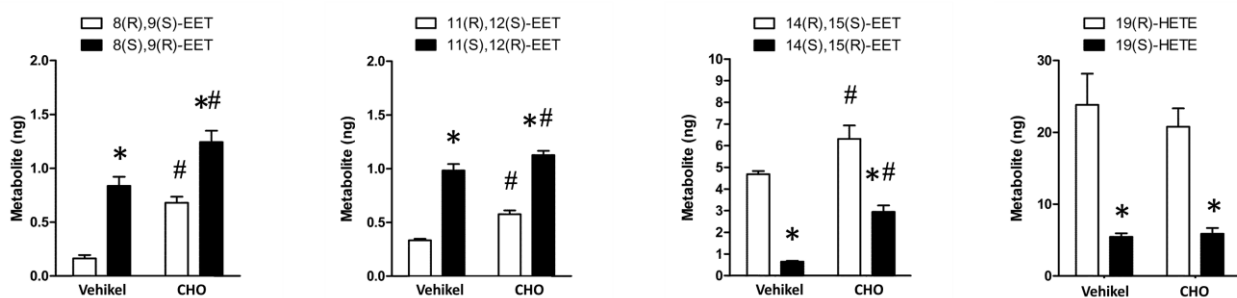
Gleichzeitig liefern die Daten ein Bild der hepatischen CYP-Aktivität, die im Rahmen dieser Versuche erstmalig unbeeinflusst von stereospezifischen Effekten der mEH beobachtet wurde. Demnach weisen die CYPs sowohl in murinen als auch humanen Lebermikrosomen eine enantioselektive Präferenz zur Bildung von 14,15-EET in (*R,S*)-Konfiguration auf. Organismische Unterschiede bestehen bei der Bildung von Enantiomeren aus 8,9- und 11,12-EET, sowie 19-HETE, das in humanen Lebermikrosomen mit klarer Präferenz für die S-Konfiguration gebildet wird. Eine Verschiebung des Enantiomerenmusters von 19-HETE durch CHO tritt hingegen nicht auf.

Zusammenfassend ist der Befund herauszustellen, dass CYP-abhängig gebildete EETs und EEQs durch mEH rapide und enantioselektiv abgebaut werden und CHO als ein geeigneter, spezifischer Inhibitor der mEH verwendet werden kann.

### A: Murine Lebermikrosomen



### B: Humane Lebermikrosomen



## Abbildung 3-31 Rolle der mEH bei der Bildung von EETs durch murine und humane Lebermikrosomen

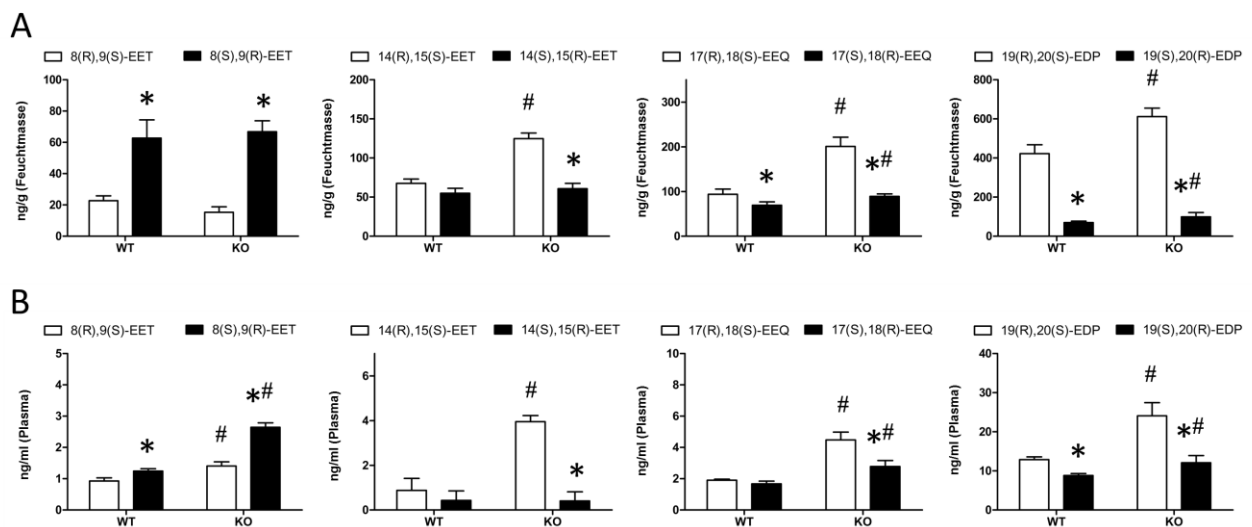
Der NADPH-abhängige Metabolismus von AA (10  $\mu$ M) wurde anhand von Lebermikrosomen A) von sEH-KO-Mäusen und B) des Menschen in Gegenwart des sEH-Inhibitors TPPU (2  $\mu$ M) untersucht. Die Inkubationen enthielten 0,8 ml/ml Protein und wurden innerhalb von 10 min in Abwesenheit („Vehikel“) oder Gegenwart („CHO“) des mEH-Inhibitors Cyclohexenoxid durchgeführt. Die extrahierten Metaboliten wurden mittels chiraler ESILC-MS/MS („Chiral-1“ und „Chiral-2“) analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Inkubationen  $\pm$  SD gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt bezeichnet: \*  $p < 0,05$  vs. korrespondierendes (*R,S*)/(*R*)-Enantiomer und #  $p < 0,05$  vs. Vehikel. (Mann-Whitney-Test).



### 3.3.4 Bildung enantiomerer Monoepoxide bei sEH-KO-Mäusen *in vivo*

Die Ausschaltung des sEH-Gens (EPHX2) ist bereits vielfach im Mausmodell genutzt worden, um die protektive Rolle der PUFA Monoepoxide bei kardiovaskulären- und Entzündungserkrankungen zu erforschen [34, 123]. Der Einfluss des sEH-knockouts auf die enantiomere Verteilung endogener Monoepoxide blieb dabei jedoch unklar. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Chiralphasenanalytik wurde daher genutzt, um Leber- und Plasmaproben von Wildtyp (WT)- und Knockout (KO)-Mäusen zu untersuchen. Die Tiere wurden zunächst auf einer EPA- und DHA-reichen Diät für drei Wochen lang gehalten, um in der Analytik ein breites Spektrum der biologisch aktiven Metaboliten abzudecken.

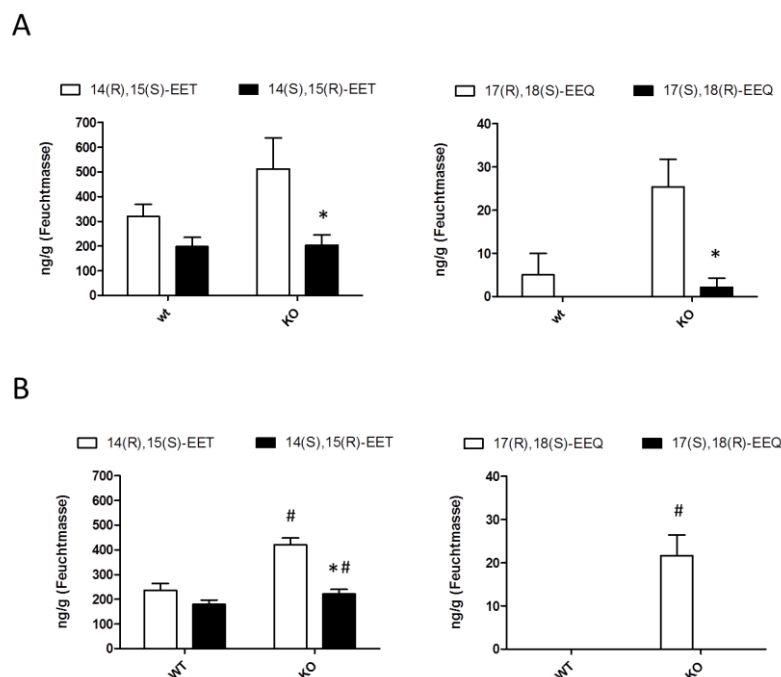
Abbildung 3-32 zeigt eine Auswahl der chiral gemessenen Metaboliten in WT- und KO-Mauslebergewebe und Plasma. Erkennbar war zunächst eine besondere Wirkung des Knockouts auf die Enantiomere der endständigen Epoxide 14,15-EET, 17,18-EEQ und 19,20-EDP: Während das (*S,R*)-Enantiomer in KO-Tieren jeweils kaum erhöht war, lag die (*R,S*)-Konfiguration deutlich erhöht vor. Der Befund stimmt mit der in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Stereospezifität der sEH überein, wobei sich auch die besondere Präferenz des Enzyms für 14(*R*),15(*S*)-EET insbesondere im Plasma wiederfand.



**Abbildung 3-32 Beeinflussung des endogenen Enantiomerenmusters durch sEH in Mäusen**

Leber A) und Plasmaproben B) wurden aus Wildtypen und sEH-KO Mäusen präpariert, nachdem die Tiere über drei Wochen eine mit EPA und DHA supplementierte Diät erhielten. Das enantiomere Muster der Eicosanoide wurde mittels chiraler LC-ESI-MS/MS bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte aus 5-6 Tieren  $\pm$  SEM gezeigt. Sie repräsentieren die totalen Metaboliten (freie und esterifizierte) und wurden mittels alkalischer Hydrolyse zugänglich. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt bezeichnet: \*( $p < 0,05$ ) vs. korrespondierendes (*R,S*)-enantiomer und #( $p < 0,05$ ) vs. WT (Mann-Whitney-U-Test).

Bei den Mauselebern von Tieren aus EPA- und DHA-reicher Diät trat der Effekt des sEH-Knockouts deutlich im Enantiomeren-Muster von 14,15-EET und 17,18-EEQ hervor (Abbildung 3-32). Es folgte daraufhin eine Prüfung, ob sich dieser signifikante Effekt auch in Mauselebern reproduziert, die von Tieren aus Normalfutter-Haltung oder einer omega-6-reichen Diät stammten. Abbildung 3-33 zeigt, dass sich die Knockout-abhängige Verschiebung des Enantiomeren-Musters in diesen Lebern deutlich wiederfand.



**Abbildung 3-33 Beeinflussung des Enantiomeren-Musters von 14,15-EET und 17,18-EEQ durch sEH in Mauselebern aus Normalfutter- und Omega-6-reicher Diät**

Wildtypen und sEH-KO Mäuse erhielten Normalfutter (A) oder über drei Wochen eine Omega-6-reichen Diät (B). Das enantiomere Muster von 14,15-EET und 17,18-EEQ wurde mittels chiraler LC-ESI-MS/MS bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte aus 4-6 Tieren  $\pm$  SEM gezeigt. Sie repräsentieren die totalen Metaboliten (freie und esterifizierte) und wurden mittels alkalischer Hydrolyse zugänglich. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt bezeichnet: \*( $p < 0,05$ ) vs. korrespondierendes (R,S)-enantiomer und #( $p < 0,05$ ) vs. WT (Mann-Whitney-U-Test).

Andere Monoepoxide wurden ebenfalls durch den sEH-Knockout beeinflusst, wenn auch in nicht so ausgeprägter Weise wie bei den endständigen Epoxiden und nur selten mit deutlich enantiospezifischer Präferenz, etwa bei 8,9-EET im Plasma (siehe Abbildung 3-32), sowie 16,17-EDP in Plasma und Leber. Die einzelnen Messdaten für alle Metaboliten sind in den Tabellen 3-10 und 3-11 aufgelistet. Bemerkenswert ist hierzu ferner, dass mittig im Molekül angeordnete Epoxidgruppen von 11,12-EET, 11,12-EEQ und 13,14-EDP *in vivo* offenbar kein Substrat für die sEH darstellen, denn es fanden sich in der KO-Gruppe keine signifikant veränderten Level der jeweiligen Enantiomere. Die Monohydroxide wurden ebenfalls analysiert, wobei sich erwartungsgemäß kein spezifischer Effekt des Knockouts auf diese Metaboliten ergab.

Ein eher überraschender Befund war der deutliche Enantiomerenüberschuss bei der Mehrzahl der gemessenen Monoepoxide in Wildtyp-Tieren. So lagen beispielsweise 8,9-EET und 11,12-EET vorwiegend in der (*S,R*)-Konfiguration vor. Die Monohydroxide wurden hingegen erwartungsgemäß als weitestgehend racemisch unter diesen physiologischen Bedingungen vorliegend bestimmt, Ausnahmen bildeten 12-HETE und 12-HEPE im Plasma (Tabelle 3-14).

**Tabelle 3-14 Chirales Eicosanoid-Profil in der Mausleber<sup>1</sup>**

	Murine Liver																			
	WT					KO				WT					KO					
	(R) ± SEM	(S) ± SEM	Ratio (i)	(R) ± SEM	(S) ± SEM	Ratio (i)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)								
5-HETE	118.9	14.5	115.8	17.1	1.0	120.7	23.3	108.9	15.7	1.1	234.6	29.4	216.3	18.6	1.1	229.6	38.1	218.4	17.1	1.1
9-HETE	54.6	9.1	49.7	8.0	1.1	57.0	11.0	60.4	13.6	0.9	104.2	16.8	83.0	11.9	1.3	117.4	23.9	94.6	15.2	1.2
11-HETE	54.0	11.2	51.2	9.2	1.1	55.7	13.6	58.3	13.9	1.0	105.2	20.2	76.0	6.4	1.4	114.0	27.5	79.5	5.6	1.4
12-HETE	61.8	9.3	42.1	6.9	1.5	66.3	13.8	39.6	2.4	1.7	103.9	11.2	74.6	8.8	1.4	105.9	12.5	77.3	5.5	1.4
15-HETE	87.8	12.3	99.8	12.3	0.9	94.4	20.9	95.3	22.7	1.0	187.6	24.3	144.7	19.5	1.3	189.7	43.3	144.2	16.0	1.3
19-HETE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5-HEPE	156.7	31.3	187.1	42.7	0.8	177.3	44.8	200.1	46.9	0.9	190.6	27.3	240.1	23.9	0.8	180.3	17.3	286.6	23.6	0.6
9-HEPE	112.0	30.2	137.3	34.2	0.8	140.2	48.7	162.8	51.2	0.9	111.6	18.4	82.4	8.1	1.4	98.2	6.6	99.4	9.9	1.0
12-HEPE	78.0	15.9	69.8	16.2	1.1	83.8	20.7	73.5	17.1	1.1	83.6	13.3	78.9	9.7	1.1	79.8	8.3	86.3	5.7	0.9
15-HEPE	61.7	12.5	88.4	21.0	0.7	69.7	17.2	97.1	24.2	0.7	84.5	16.4	57.5	13.0	1.5	84.9	8.2	100.0	10.9	0.8
17-HDHA	132.6	17.9	133.0	18.7	1.0	133.8	15.8	141.4	12.1	0.9	265.6	36.2	237.1	26.0	1.1	275.2	26.3	298.3	19.0	0.9
	(R,S) ± SEM	(S,R) ± SEM	Ratio (i)	(R,S) ± SEM	(S,R) ± SEM	Ratio (i)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)					
8,9-EET	22.7	3.0	62.7	11.7	0.4	15.3	3.4	66.8	6.9	0.2	85.5	14.4	79.2	8.8	1.1	82.1	8.1	99.4	6.6	0.8
11,12-EET	39.4	4.6	111.6	26.4	0.4	41.2	6.0	110.5	26.4	0.4	150.9	30.9	83.5	8.5	1.8	151.8	29.7	93.7	5.1	1.6
14,15-EET	67.6	5.5	54.9	6.4	1.2	124.7	7.1	60.8	6.8	2.1	122.6	10.0	148.4	10.7	0.8	185.6	12.6	243.0	9.1	0.8
17,18-EEQ	93.8	11.7	69.4	7.5	1.4	200.9	20.6	89.0	5.6	2.3	180.2	8.9	227.3	30.5	0.8	289.9	22.2	359.6	31.2	0.8
19,20-EDP	422.3	45.6	116.5	14.2	3.6	611.7	43.4	98.8	22.4	6.2	582.1	45.0	1075.4	105.4	0.5	710.5	35.9	1331.6	76.3	0.5
	(P 1) ± SEM	(P 2) ± SEM	Ratio (i)	(P 1) ± SEM	(P 2) ± SEM	Ratio (i)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)					
18-HEPE	130.5	25.5	136.9	27.6	1.0	150.2	41.0	160.8	41.5	0.9	160.4	28.1	238.5	31.6	0.7	154.6	15.5	252.8	25.2	0.6
8,9-EEQ	12.1	6.7	25.0	12.4	0.5	18.7	8.4	35.5	15.9	0.5	74.2	12.9	107.6	15.1	0.7	108.4	1.7	147.3	16.4	0.7
11,12-EEQ	19.8	9.4	21.6	10.4	0.9	19.9	8.9	23.2	10.5	0.9	82.8	10.9	61.5	6.9	1.3	86.2	3.2	72.8	5.9	1.2
14,15-EEQ	58.0	7.3	32.4	3.8	1.8	94.3	4.1	42.7	5.2	2.2	90.4	8.1	111.0	11.0	0.8	137.0	4.9	176.1	13.3	0.8
7,8-EDP	77.3	7.6	102.8	15.4	0.8	80.3	1.8	135.0	33.3	0.6	180.1	12.9	150.7	15.2	1.2	215.3	32.2	164.9	11.9	1.3
13,14-EDP	41.8	19.2	29.2	13.4	1.4	33.4	15.5	27.3	12.3	1.2	142.1	7.7	132.6	7.5	1.1	121.5	4.4	134.2	6.6	0.9
16,17-EDP	106.4	11.6	37.4	2.2	2.8	159.4	11.8	37.0	5.7	4.3	143.8	12.9	203.9	13.8	0.7	196.4	13.9	290.9	15.5	0.7

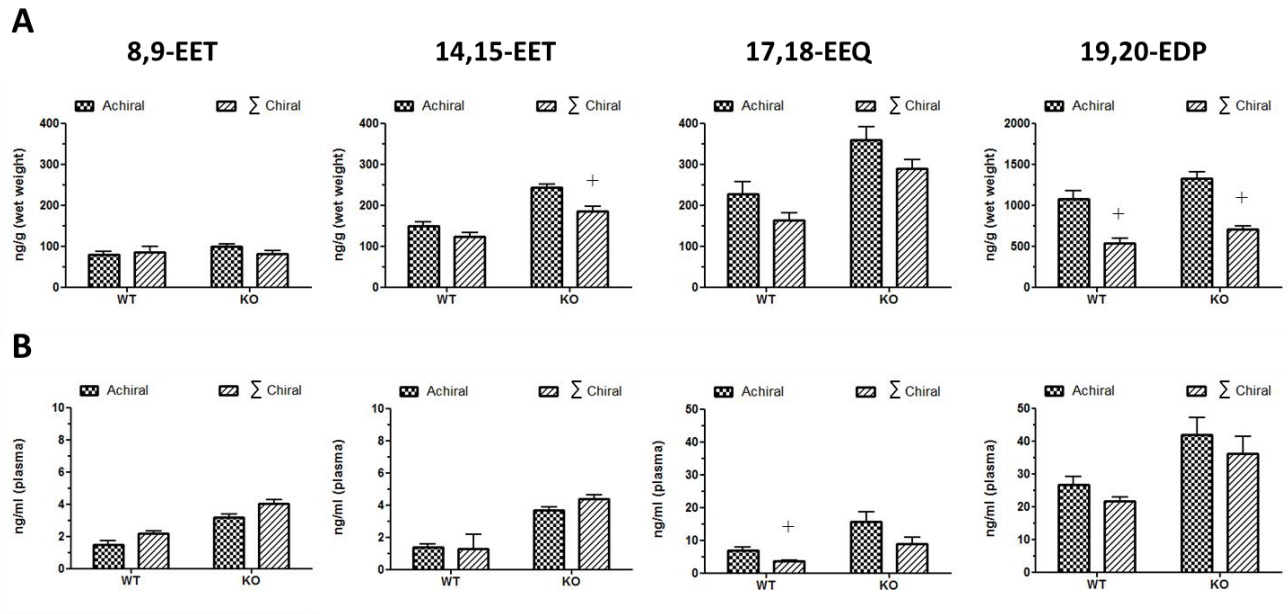
<sup>1</sup> Proben aus sEH KO und WT Mäusen wurden nach drei Wochen einer EPA- und DHA-reichen Diät entnommen (n = 5-6 pro Gruppe). Die Daten sind in ng/g Feuchtmasse angegeben ± SEM. Grau hinterlegte Felder zeigen signifikanten Enantiomerenüberschuss an (Mann-Whitney-Test; p<0,05). Die Ratios beziehen sich (i) auf die enantiomere Zusammensetzung oder (ii) auf die Summe eines gemessenen Enantiomeren-Paars, das mit dem totalen Level dieser Metaboliten aus achiraler Analyse ins Verhältnis gesetzt wurde.

**Tabelle 3-15 Chirales Eicosanoid-Profil in Mausplasma<sup>1</sup>**

	Murine Plasma											
	WT			KO			WT			KO		
	(R) ± SEM	(S) ± SEM	Ratio (i)	(R) ± SEM	(S) ± SEM	Ratio (i)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)
5-HETE	4.4 0.6	3.5 0.5	1.3	4.1 0.8	3.4 0.6	1.2	8.0 1.1	5.8 0.7	1.4	7.5 1.4	6.9 0.4	1.1
9-HETE	0.3 0.1	0.4 0.1	0.7	0.5 0.0	0.6 0.2	0.8	0.8 0.3	1.4 0.2	0.6	1.1 0.2	1.9 0.3	0.6
11-HETE	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		n.d.	0.2 0.1		n.d.	0.5 0.2	
12-HETE	0.2 0.2	13.7 3.9	0.0	0.3 0.3	9.2 1.5	0.0	13.9 4.1	12.4 3.5	1.1	9.5 1.5	12.1 1.6	0.8
15-HETE	1.8 0.2	1.8 0.2	1.0	1.6 0.6	1.6 0.5	1.0	3.6 0.4	2.9 0.4	1.2	3.2 1.0	3.6 0.5	0.9
19-HETE	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		n.d.	1.3 0.2		n.d.	1.2 0.2	
5-HEPE	3.4 0.3	4.1 0.2	0.8	3.9 0.3	5.3 0.6	0.7	7.5 0.5	5.0 0.5	1.5	9.1 0.7	9.3 2.6	1.0
9-HEPE	2.1 0.2	2.2 0.1	1.0	2.9 0.5	3.2 0.6	0.9	4.3 0.3	2.0 0.3	2.2	6.2 1.0	4.7 2.5	1.3
12-HEPE	n.d.	19.7 6.7		0.7 0.7	22.2 7.7	0.0	19.7 6.7	33.5 8.1	0.6	22.9 8.0	40.4 8.7	0.6
15-HEPE	2.5 0.2	3.1 0.3	0.8	3.6 0.5	3.8 0.6	0.9	5.6 0.4	2.6 0.3	2.2	7.4 1.1	6.6 2.7	1.1
17-HDHA	0.9 0.0	1.3 0.1	0.7	1.0 0.1	1.3 0.1	0.7	2.1 0.1	2.3 0.2	0.9	2.3 0.1	3.4 0.7	0.7
	(R,S) ± SEM	(S,R) ± SEM	Ratio (i)	(R,S) ± SEM	(S,R) ± SEM	Ratio (i)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)
8,9-EET	0.9 0.1	1.2 0.1	0.7	1.4 0.1	2.6 0.1	0.5	2.2 0.2	1.5 0.3	1.5	4.0 0.2	3.2 0.2	1.3
11,12-EET	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		n.d.	0.9 0.1		n.d.	1.6 0.1	
14,15-EET	0.9 0.5	0.4 0.4	2.1	4.0 0.3	0.4 0.4	9.7	1.3 0.9	1.4 0.2	0.9	4.4 0.3	3.7 0.2	1.2
17,18-EEQ	1.9 0.1	1.7 0.2	1.1	4.5 0.4	2.8 0.3	1.6	3.6 0.2	7.0 0.9	0.5	9.0 1.9	15.8 3.0	0.6
19,20-EDP	12.9 0.7	8.8 0.5	1.5	24.1 3.4	12.1 1.8	2.0	21.7 1.1	26.7 2.6	0.8	36.2 5.2	42.0 5.1	0.9
	(P 1) ± SEM	(P 2) ± SEM	Ratio (i)	(P 1) ± SEM	(P 2) ± SEM	Ratio (i)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)	Chiral ± SEM	Achiral ± SEM	Ratio (ii)
18-HEPE	2.7 0.2	3.2 0.2	0.8	3.9 0.4	4.3 0.4	0.9	6.0 0.4	4.7 0.5	1.3	8.2 0.9	9.7 2.8	0.8
8,9-EEQ	0.8 0.4	3.4 0.5	0.3	3.3 0.4	6.6 1.4	0.5	4.2 0.8	2.0 0.4	2.1	10.0 1.8	6.7 1.0	1.5
11,12-EEQ	1.0 0.1	1.8 0.2	0.5	1.5 0.2	2.9 0.4	0.5	2.7 0.3	1.7 0.4	1.6	4.5 0.6	3.6 0.7	1.2
14,15-EEQ	1.5 0.1	1.2 0.1	1.2	4.7 1.0	2.4 0.5	2.0	2.7 0.2	1.6 0.2	1.7	7.1 1.5	4.5 0.9	1.6
7,8-EDP	5.4 0.6	3.7 0.4	1.4	8.0 0.7	6.5 0.3	1.2	9.1 1.0	10.0 1.3	0.9	14.5 0.9	13.5 1.2	1.1
13,14-EDP	1.2 0.1	3.6 0.5	0.3	1.6 0.2	5.0 0.5	0.3	4.8 0.6	4.3 0.7	1.1	6.6 0.7	5.4 0.7	1.2
16,17-EDP	1.0 0.1	0.9 0.1	1.1	2.6 0.4	1.6 0.1	1.6	1.9 0.2	2.2 0.2	0.9	4.2 0.5	5.1 0.6	0.8

<sup>1</sup> Plasma-Proben aus sEH KO und WT Mäusen wurden nach drei Wochen einer EPA- und DHA-reichen Diät gewonnen (n = 5-6 pro Gruppe). Die Daten sind in ng/ml Plasma angegeben ± SEM. Grau hinterlegte Felder zeigen signifikanten Enantiomerenüberschuss an (Mann-Whitney-Test; p<0,05). Die Ratios beziehen sich (i) auf die enantiomere Zusammensetzung oder (ii) auf die Summe eines gemessenen Enantiomeren-Paars, das mit dem totalen Level dieser Metaboliten aus achiraler Analyse ins Verhältnis gesetzt wurde.

Die chirale Analyse der biologischen Proben wurde mittels des achiralen Referenzsystems auf Validität hin geprüft. Dazu wurde die Summe aus den chiral gemessenen korrespondierenden Enantiomeren gebildet und mit den Messdaten aus dem achiralen System verglichen. Abbildung 3-34 illustriert den Vergleich der Messdaten für die in Abbildung 3-32 gezeigten Metaboliten. Dabei war eine hervorragende Übereinstimmung der Analyt-Quantitäten festzustellen. Vereinzelt ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen chiraler und achiraler Quantifizierung. Wie aus den Tabellen 3-14 und 3-15 hervorgeht, betrug die Abweichung der Summe der Enantiomere nach unten höchstens 50% für 19,20-EDP in Maus-Leber beziehungsweise 50-60% für 17,18-EEQ im Maus-Plasma, und nach oben maximal 160-180 % für 11,12-EET in Mauslebergewebe, beziehungsweise 220% für 15-HEPE im Plasma von Wildtyp-Mäusen. Eine Abweichung von Faktor Zwei wurde demnach mit Ausnahme von 15-HEPE in bestimmten Plasma-Proben nicht überschritten, was gemessen an der Anzahl der berücksichtigten Metaboliten und der unterschiedlichen chromatografischen Systeme als sehr zufriedenstellend eingeschätzt werden kann.



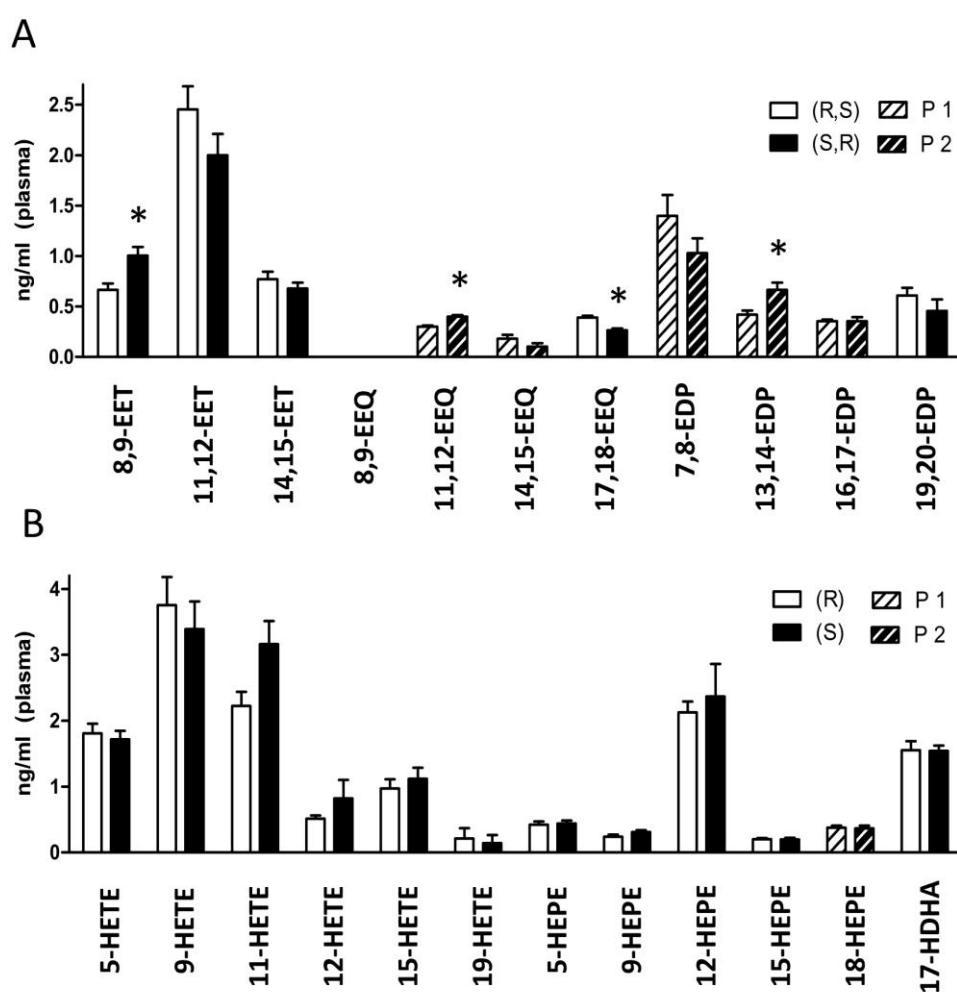
**Abbildung 3-34 Beeinflussung des endogenen Enantiomerenmusters durch sEH in Mäusen**

Leber A) und Plasmaproben B) wurden aus Wildtypen und sEH-KO Mäusen präpariert, nachdem die Tiere über drei Wochen eine mit EPA und DHA supplementierte Diät erhielten. Das enantiomere Muster der Eicosanoide wurde mittels chiraler LC-ESI-MS/MS bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte aus 5-6 Tieren  $\pm$  SEM gezeigt. Sie repräsentieren die totalen Metaboliten (freie und esterifizierte) und wurden mittels alkalischer Hydrolyse zugänglich. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt bezeichnet: +( $p < 0,05$ ) vs. achiral (Mann-Whitney-U-Test).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die chirale Zusammensetzung endogener Eicosanoide in Extrakten aus Mausleber und Mausplasma erfolgreich bestimmt werden konnte, wobei durch eine EPA- und DHA-reiche Ernährung der Tiere auch die endogenen Enantiomere der aus omega-3-Fettsäure abgeleiteten Metaboliten erfolgreich quantifizierbar waren. Die in Abschnitt 3.2. etablierte Chiralphasenanalytik diente zur Messung und lieferte valide Ergebnisse bei der Messung endogener Metaboliten in komplexer Matrix. Der sEH-Knockout wirkte sich auf das enantiomere Profil vieler Monoepoxide ganz erheblich aus, was bei früheren Betrachtungen der Regioisomere nicht auffallen konnte. Der Effekt der sEH ist *in vivo* somit größer als bisher angenommen. Die Bestimmung eines spezifischen endogenen Enantiomerenprofils der Monoepoxide hat das Potential, Aussagen über die sEH-Aktivität und somit den pathophysiologischen Zustand eines Organs oder Organismus zu liefern. Eine pharmakologische Unterdrückung der sEH-Aktivität könnte ferner die Verfügbarkeit solcher Enantiomere wie 14(*R*),15(*S*)-EET und 17(*R*),18(*S*)-EEQ begünstigen, für die eine protektive Rolle für das Herz-Kreislaufsystem wie auch entzündungshemmende Eigenschaften beschrieben sind.

### 3.3.5 Chirale Eicosanoidanalyse in humanem Plasma

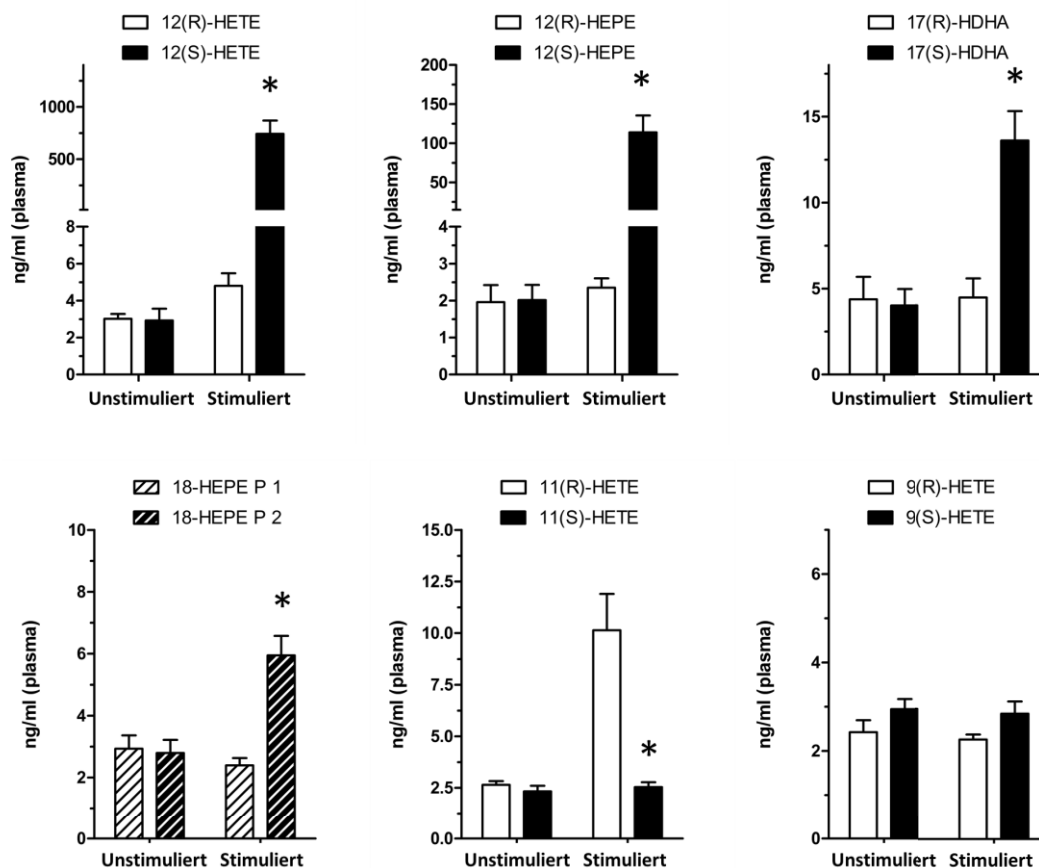
Die in Abschnitt 3.2 beschriebene neue chirale Methode diente als Grundlage, um auch in humanem Plasma ein Profil der endogenen Eicosanoid-Enantiomere zu bestimmen. Dazu wurden Proben von 6 gesunden Probanden genommen, die im Rahmen einer früheren Studie für 8 Wochen eine EPA- und DHA-reiche Diät zu sich nahmen [111]. Mit Ausnahme von 8,9-EEQ befanden sich alle im Messprogramm enthaltenen Metaboliten oberhalb des LLOQ und konnten quantifiziert werden.



**Abbildung 3-35 Profil der enantiomeren Eicosanoide in humanem Plasma**

Die Plasmaproben wurden aus gesunden Probanden gewonnen, nach 8 Wochen einer EPA- und DHA-reichen Diät. Die enantiomere Zusammensetzung der Eicosanoide wurde mittels chiraler LC-ESI-MS/MS analysiert. A) Level der enantiomeren Monoepoxide. B) Level der enantiomeren Monohydroxide. Die Daten sind als Mittelwerte aus 6 Probanden, davon drei männlich und drei weiblich  $\pm$  SEM gezeigt. Sie repräsentieren die totalen Metaboliten (freie und esterifizierte) und wurden mittels alkalischer Hydrolyse zugänglich. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt bezeichnet: \*( $p < 0,05$ ) vs. korrespondierendes (R,S)/(R)/(P 1)-Enantiomer (Mann-Whitney-U-Test).

Abbildung 3-35 gibt die Level der 46 bestimmten Enantiomere der Monohydroxide und Monoepoxide im Plasma wieder. Unter diesen physiologischen Bedingungen traten die Enantiomere der Monohydroxide etwa zu gleichen Anteilen auf. Dagegen wurde ein signifikanter Enantiomerenüberschuss für die Monoepoxide 8,9-EET, 11,12-EEQ, 17,18-EEQ und 13,14-EDP beobachtet, der jedoch viel geringer ausgeprägt war als in Plasmaproben von Wiltyp-Mäusen (vgl. Abschnitt 3.3.4).



### Abbildung 3-36 $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor-stimulierte stereospezifische Bildung von Monohydroxiden in humanen Vollblutproben

Die Vollblutproben wurden aus gesunden Probanden gewonnen, nach 8 Wochen einer EPA- und DHA-reichen Diät. Sie wurden unmittelbar nach Gewinnung mit A23187 oder einer Vehikelkontrolle 30 min inkubiert. Die enantiomere Zusammensetzung der Eicosanoide wurde mittels chiraler LC-ESI-MS/MS analysiert. A) Level der enantiomeren Monoepoxide. B) Level der enantiomeren Monohydroxide. Die Daten sind als Mittelwerte aus 6 Probanden, davon drei männlich und drei weiblich  $\pm$  SEM gezeigt. Sie repräsentieren die totalen Metaboliten (freie und esterifizierte) und wurden mittels alkalischer Hydrolyse zugänglich. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt bezeichnet: \*( $p < 0,05$ ) vs. korrespondierendes (R)/(P)-Enantiomer (Mann-Whitney-U-Test).

Ein deutlich enantiospezifischer Effekt wurde nach Stimulation der de novo Synthese von Monohydroxiden beobachtet. Dabei wurden Vollblutproben mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A23187 stimuliert. Die Blutproben stammten von jeweils drei männlichen und weiblichen gesunden Probanden, acht Wochen nach Beginn einer EPA- und DHA-reichen Diät. Wie aus Abbildung 3-35 hervorgeht, bewirkte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophorstimulation einen Anstieg von 12(*S*)-HETE und 12(*S*)-HEPE um mehrere Größenordnungen, auch 17(*S*)-HDHA war stark erhöht. Diese Befunde stimmen mit der bereits bekannten Enantiospezifität von entsprechenden LOX-Enzymen überein und demonstrieren somit die Plausibilität der mittels Chiralphasenanalytik erhobenen Daten aus klinischen Proben. Ein bemerkenswerter Befund war eine ebenso enantiospezifische Stimulation der Bildung des Precursors der E-Resolvine 18-HEPE, an der den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge möglicherweise auch CYPs wie 1A1 beteiligt sein könnten. Ferner war ein signifikant erhöhtes Level von 11(*R*)-HETE in stimulierten Proben festzustellen. Dies deutet auf eine COX-Aktivität hin. Von Enzymen unabhängig gebildete Monohydroxide wie 9-HETE lagen stets etwa racemisch vor und wurden durch die Stimulation nicht beeinflusst (Abbildung 3-35).

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3 zusammengefasst ergaben, dass die in Kapitel 3.2 etablierte Chiralphasenanalytik zur Anwendung auf in vitro- wie auch in vivo genommene Proben geeignet ist und Ergebnisse liefert, die entweder aufgrund bekannter Tatsachen biologisch plausibel und/oder durch Vergleiche mit Messdaten aus der achiralen Analytik validiert werden konnten. In biologischer Hinsicht, konnte die ausgeprägte Stereoselektivität von CYP1A1 für 17,18-EEQ bestätigt und für 18-HEPE erstmalig festgestellt werden. Weiterhin wurde der tatsächliche Einfluss der sEH auf die Enantiomere endogener Monoepoxide im Mausmodell beschrieben. Weiterhin wurde erstmalig die Stereospezifität der mEH in vitro beschrieben und deren gegensätzliche Präferenz im Vergleich zur sEH festgestellt. Inkubationen mit Gewebsmikrosomen bestätigten diese Präferenzen und zeigten die Interaktion von mEH und CYPs in den Membranen auf. Zudem wurde erstmalig ein breites Profil von Enantiomeren der Monohydroxide wie auch Monoepoxide in humanem Plasma gesunder Probanden erstellt. Ein Stimulationsversuch mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor lieferte neben erwarteten Resultaten Hinweise auf die enzymatische Bildung des Resolvin-Precursors 18-HEPE *in vivo*.



## **4. Diskussion**

## **4.1 CYP-Eicosanoide als Modulatoren des akuten Nierenschadens**

### **4.1.1 Eine Imbalance freier EETs und 20-HETE ist assoziiert mit I/R-Schaden in Rattennieren**

Ein Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Befund, dass in der initialen Phase der renalen I/R eine starke Akkumulation freier CYP-Eicosanoide festzustellen ist, insbesondere von 20-HETE und der DHETs, während EETs kaum erhöht vorliegen. Im UNX-Modell des I/R-Schadens an Rattennieren zeigt die mangelhafte Sauerstoffversorgung der Niere, sowie das proinflammatorische und apoptotische Schadensbild in der Reperfusionsphase jene Pathophysiologie auf, wie es eher für 20-HETE-, nicht jedoch für EET-Aktivität beschrieben ist, siehe Abbildung 4-2. Übereinstimmend dazu ist die beobachtete Dephosphorylierung von Akt und GSK3 $\beta$  [112]. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen ischämischem Nierenschaden und nicht erhöhten freien EET-Level wird anhand einer Behandlungsgruppe aufgezeigt, der unmittelbar vor Beginn der Ischämie ein stabiles EET-Analog appliziert wurde, das den ausbleibenden Anstieg freier EETs kompensieren sollte. Hier treten die beobachteten Nierenschäden weniger stark auf, und im Magnet-Resonanz-Bild (MRI) ist eine verbesserte Sauerstoffversorgung in der Reperfusionsphase erkennbar [112]. In einer früheren Untersuchung eines 20-HETE-Inhibitors im gleichen Versuchsmodell wird ebenfalls eine Verringerung des I/R-Schadens beobachtet [41]. Die Schutzwirkung des EET-Analogs fällt jedoch noch deutlicher aus, nicht zuletzt in Bezug auf die Rephosphorylierung der genannten Proteinkinasen [112]. Die Versuche zeigen erstmalig auf, dass ein EET-Analog effektiv gegen renalen I/R-Schaden schützt.

Um die Ursache der auftretenden Imbalance der freien 20-HETE- und EET-Level zu ergründen, sind zwei unterschiedliche Herangehensweisen denkbar. Ein Aspekt könnte die möglicherweise spezifische Freisetzung von 20-HETE und EETs aus den Phospholipiden der Membranen sein. In diesen liegen neben PUFAs auch Eicosanoide wie 20-HETE und EETs gespeichert vor [29, 32, 49]. Unter den sauerstoffarmen ischämischen Bedingungen, sind diese veresterten Formen vermutlich die Hauptquelle freier Eicosanoide. Die zur Freisetzung bedeutsame Ca<sup>2+</sup>-abhängige PLA<sub>2</sub> liegt in der ischämischen Niere aktiviert vor und transloziert an die Membranen [129]. Studien in Mäusen, denen die cytosolische PLA<sub>2a</sub> fehlt, deuten darauf hin, dass dieses Enzym signifikant zum I/R-Schaden im Herzen und Gehirn beiträgt [8, 130, 131]. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass der PLA<sub>2</sub>- Inhibitor Quinacrine gegen Glycerol-induzierte AKI in Ratten schützt [132]. Interventionsstudien mit PLA<sub>2</sub>-Inhibitoren wären an einem *ex vivo* - Modell der isolierten perfundierten Niere (IPK) denkbar. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit ein IPK-System etabliert, das über 60 min Perfusionsdauer stabil ist und die Basis dafür bilden kann, die Biologie der Niere

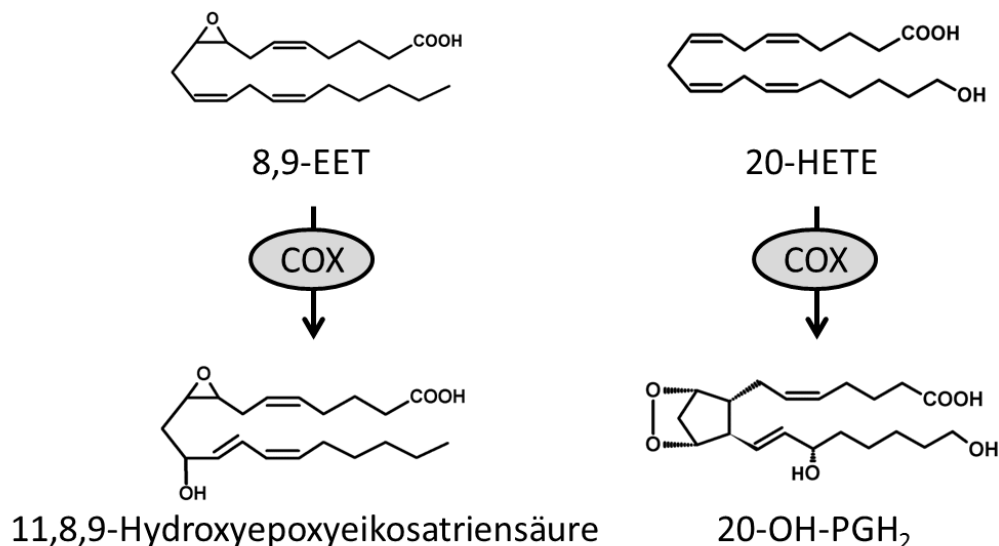
unabhängig von organismischen Einflüssen zu beschreiben und gezielt zu modulieren [87, 115, 133], siehe Kapitel 3.1.2.

Eine andere Herangehensweise zur Aufklärung der aufgetretenen Imbalance von freien 20-HETE und EETs in der initialen Phase des I/R-Schadens ergibt sich aus dem Befund, dass auch die DHET-Level stark ansteigen. Dies deutet darauf hin, dass EETs möglicherweise gleichermaßen wie 20-HETE freigesetzt werden, jedoch in Gegenwart von sEH eine rapide Hydrolyse und somit Inaktivierung erfolgt (vgl. Abschnitt 4.1.4). Diese Beobachtung macht in pharmakologischer Hinsicht deutlich, wie bedeutsam entweder das Inhibieren der sEH-Aktivität [30, 134] oder aber das Bereitstellen stabiler Monoepoxid-Analoga [31, 135] sein dürfte, um die Schäden eines akuten Nierenschadens und potentiell auch andere ischämische Organschäden einzudämmen. Das in dieser Arbeit applizierte EET-Analog stellt infolge eines Austauschs der Epoxid- durch eine Urea-Gruppe kein Substrat für sEH dar und konnte so den Verlust der EETs kompensieren und wie eingangs beschrieben den I/R-Schaden erheblich verringern. Dass in Gegenwart des Analogs auch die EET-Level in der Reperfusionsphase ansteigen, stimmt zwar mit der protektiven Wirkung überein, lässt sich mechanistisch gegenwärtig jedoch nicht ohne weiteres erklären. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einer durch das EET-Analog induzierten endothelilalen NO-Bildung, wie sie für die natürlichen Monoepoxy-Metaboliten beschrieben wurde [136, 137]. NO wirkt zudem als Inhibitor der CYP4A-katalysierten 20-HETE-Bildung [138, 139]. Zu beachten ist in dem Zusammenhang, dass das EET-Analog im Verlauf der Reperfusionsphase rasch ausgespült wurde. Dies deutet auf die Rolle der EETs als ein frühes Glied in jener Signalkette hin, die das Schadensbild in der späteren Reperfusionsphase bestimmt. Weitere Aspekte der enzymatischen Hydrolyse von CYP-Monoepoxiden werden in Abschnitt 4.3 ausgeführt.

Das Ausmaß der auftretenden Imbalance von freien 20-HETE und EETs ist möglicherweise Abhängig von Intensität und Zeitpunkt im Ischämie-Verlauf verschieden. Die beobachtete Ischämie-bedingte EET- und 20-HETE-Freisetzung fiel bei IPK- und *in vivo*-Versuchen unterschiedlich aus. Offenbar wurde der Ischämie-Schaden modellbedingt verschieden stark induziert. Im Zeitverlauf der Ischämie treten rapide Musterverschiebungen der 20-HETE- und EET-Freisetzung auf, wie an Koronargefäßen von Hunden gezeigt wurde [140], sodass die Analyse der CYP-Eicosanoide zu einem bestimmten Zeitpunkt nur einen punktuellen Einblick in die sich rapide ändernde Verfügbarkeit freier Metaboliten gibt. Aus dieser Beobachtung heraus erklären sich möglicherweise weitere modellbedingte Unterschiede wie die Tatsache, dass sich *in vivo* bei I/R mit UNX oder aber bilateraler Ischämie unterschiedliche Aussagen in Bezug auf die Wirkung von 20-HETE ergeben [41, 51, 73, 141]. Die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Modelle des renalen Ischämie-Schadens könnte sich möglicherweise durch eine stärkere Berücksichtigung der Zeitabhängigkeit der freien CYP-Eicosanoid-Level und -Wirkung in der initialen Phase des I/R-Schadens verbessern lassen.

#### **4.1.2 Analyse des CYP-Eicosanoid-Profiles bei post-operativer AKI**

Eine wichtige Frage war, ob sich die beobachtete Rolle von 20-HETE und EETs im Modell des renalen I/R- Schadens bei Ratten möglicherweise auf die Verhältnisse bei klinisch auftretender AKI übertragen lässt. AKI ist eine häufig auftretende Komplikation bei kardiovaskulären Operationen, für die es bisher keine geeigneten Behandlungs- beziehungsweise Präventionsstrategien gibt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gefunden, dass Patienten einer Bypass-Operation, die darauffolgend AKI entwickelten, präoperativ signifikant höhere Level von 20-HETE und 8,9-EET im Plasma aufweisen, während bei 11,12- und 14,15-EET keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar sind. Ähnliche Befunde treten in Bezug auf das Auftreten von AF hervor. Die erhöhten 20-HETE-Level stehen im Einklang sowohl mit der hervortretenden Rolle von 20-HETE bei I/R-Versuchen im Rattenmodell [41, 51], als auch bei klinischer Allograft-Nierentransplantation, bei der das Ausmaß der 20-HETE-Freisetzung negativ mit der Allograft-Funktion der transplantierten Niere korreliert ist [142]. 20-HETE unterliegt einem COX-abhängigen Sekundärmetabolismus, der zu entsprechenden Prostaglandinen und Thromboxanen führt, siehe Abbildung 4-1. Die vasokonstriktive Wirkung von 20-HETE wurde in Aortenringen durch COX-Inhibition aufgehoben [26]. Für 20-OH-PGE<sub>2</sub> und 20-OH-PGF<sub>2α</sub> wurde eine vasodilatatorische Wirkung beschrieben [27], sodass zu vermuten ist, dass die insgesamt vasokonstriktive Wirkung über den Weg der 20-OH-PGH<sub>2</sub>-Bildung zu entsprechenden Thromboxanen zustande kommt. Demnach könnte die pathophysiologische Wirkung von 20-HETE zumindest teilweise auf COX-abhängige Sekundärmetaboliten zurückzuführen sein.



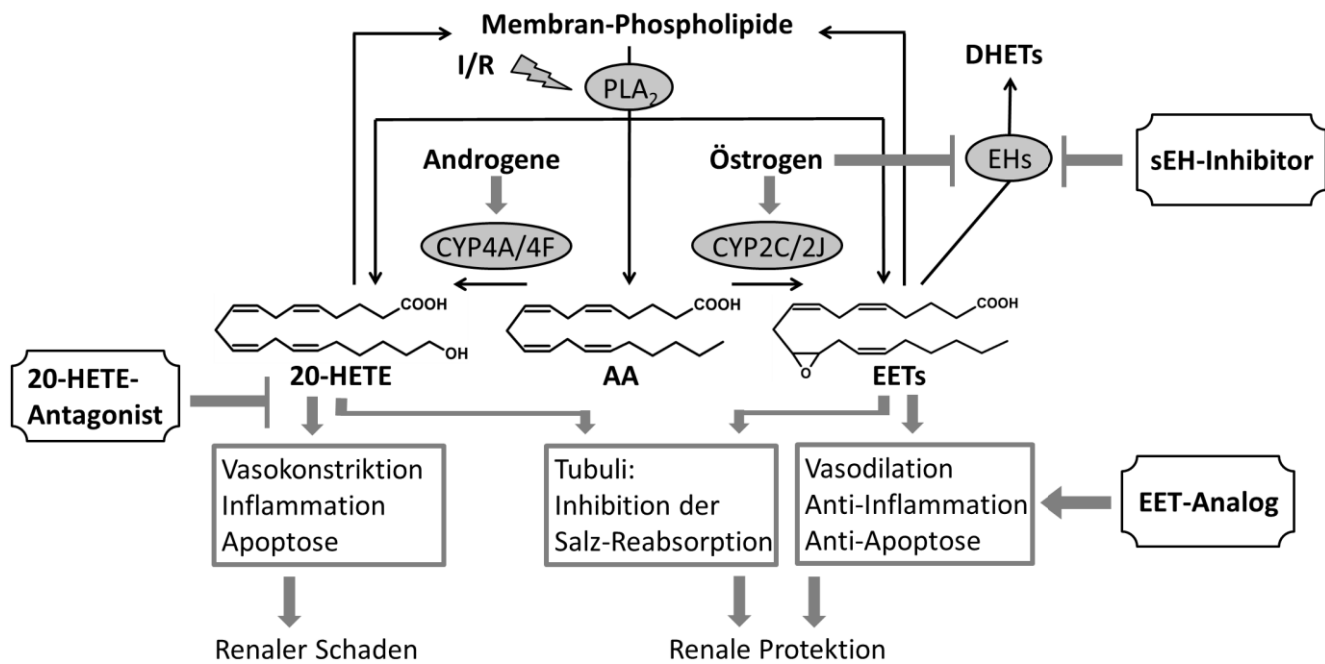
**Abbildung 4-1 Sekundärmetabolismus von 8,9-EET und 20-HETE durch COX**

Dargestellt ist, dass COX-abhängig einerseits 8,9-EET zu 11,8,9-Hydroxyepoxyeikosatriensäure, und 20-HETE zu 20-OH-PGH<sub>2</sub> umgesetzt werden können. 20-OH-PGH<sub>2</sub> ist wiederum Precursor weiterer 20-OH-Prostaglandine und 20-OH-Thromboxane. Diese sind bisher wenig beschrieben, scheinen jedoch zum Teil ebenso wie die COX-abhängigen Metaboliten von 8,9-EET vasokonstriktiv zu wirken.

In Abhängigkeit des Sekundärmetabolismus ist auch die biologische Bedeutung und Regulation der EET-Regioisomere zu betrachten. Für 8,9-EET ist renal eine vasokonstriktive Wirkung und Verringerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) beschrieben, wobei sich der Effekt umkehrt, wenn die Versuche in Gegenwart des COX-Inhibitors Indometacin durchgeführt werden [143, 144]. Sekundärmetabolismus durch COX kann für 8,9-EET demnach die Bildung von Metaboliten zufolge haben, deren Wirkung entgegengesetzt zu den EETs selbst ist. Wie in Abbildung 4-1 dargestellt, erfolgt eine Monohydroxylierung in  $\Delta 11$ -Position (in geringem Umfang auch  $\Delta 15$ -), die auch anhand der 11-HETE-Bildung durch COX belegt ist [145]. Eine verstärkte Bildung von 8,9-EET und folglich auch entsprechender Sekundärmetaboliten könnte durch CYP2C9 verursacht sein, diese humane CYP-Epoxygenase weist die größte Regioselektivität für 8,9-EET auf [80]. Ein Zusammenhang zwischen koronaren Herzerkrankungen und erhöhter vaskulärer Expression von 2C9 wurde beschrieben [146]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Zusammenhang von sEH-Aktivität und AKI nach Herz-OP feststellbar war, gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass Polymorphismen, die zu erhöhter sEH-Aktivität führen, mit einem erhöhten Risiko in diesem Kontext verbunden sind [147]. Die Rolle des CYP-Eicosanoid-Sekundärmetabolismus mit Bezügen auf dieses Kapitel wird in Abschnitt 4.1.4 ausführlich diskutiert. Neben der festgestellten Bedeutung von 20-HETE und 8,9-EET als mögliche prädiktive Biomarker für Herzoperations-bedingtes Auftreten von AKI, ist die vorliegende Analytik zirkulierender CYP-Eicosanoide im Zusammenhang kardiovaskulärer Erkrankungen auch insofern hervorzuheben, als dass derartige Untersuchungen bisher in nur sehr geringer Zahl durchgeführt wurden, gleichwohl sie als sehr vielversprechend einzuschätzend sind [4, 147].

### **4.1.3 Mechanismen der Wirkung von EETs und 20-HETE bei renalem I/R-Schaden**

Mit ihren regulativen Eigenschaften auf den Blutdruck, den Immunstatus und die Zellproliferation haben CYP-Eicosanoide einen entscheidenden Einfluss auf die Pathophysiologie bei ischämischen Organschäden (vgl. Abschnitt 1.4). Mit Fokus auf 20-HETE und EETs, wurde die Veränderung der Metaboliten in AKI-Modellen wie in Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben untersucht. Bezogen auf die Niere ist bisher nicht abschließend geklärt, ob 20-HETE den I/R-Schaden letztendlich fördert oder senkt. Abbildung 4-2 veranschaulicht die schädigenden und protektiven Effekte. Bei Rattennieren im UNX-Modell bewirkt die Inhibition von 20-HETE verringerte tubuläre Nekrose und Apoptose, verbesserte Perfusion und Anti-Inflammation in der frühen Reperfusionsphase [41, 51, 52]. Ein entgegengesetzter, protektiver Effekt ist im bilateralen I/R-Modell beschrieben [73, 148] und hängt offenbar mit der 20-HETE-vermittelten Autoregulation des Blutflusses und dem tubulär-glomerulären-Feedback-Mechanismus zusammen [49], sodass die tatsächliche Bedeutung von 20-



**Abbildung 4-2 Wirkung der CYP-AA-Eicosanoide und mögliche pharmakologische Eingriffe bei renalem I/R-Schaden**

Dargestellt ist die Aktivierung von CYP-AA-Eicosanoiden durch Freisetzung aus Membranlipiden, ihre Bildung durch jeweilige CYP-Familien und ihre biologische Wirkung in Gegenwart renaler I/R, sowie die Beeinflussung der Kaskaden durch Sexualhormone und Epoxid-Hydrolasen. Einzuschränken ist, dass die Wirkung subterminaler CYP-Monohydroxide nicht dargestellt ist, zudem ist die inhibierende Wirkung von Östrogen bisher nur auf die lösliche EH beschrieben. Therapeutische Ansätze stellen die ein Antagonist gegen 20-HETE, die Inhibition der EHs, sowie die Applizierung von EET-Analogen dar.

HETE bei AKI offen bleibt [52, 141]. Auch mechanistisch ist die Signaltransduktion noch nicht abschließend verstanden. Zwar konnte jüngst ein blutdrucksteigernder 20-HETE-Rezeptor identifiziert werden [38], dessen Expression ist in der Niere jedoch gering. Die vasokonstriktive Wirkung auf renale Arteriolen erfolgt über die Inhibition Calcium-aktivierter Kalium-Kanäle [149], über die Aktivierung mitogen-aktivierter-Proteinkinasen und weiterer Kinasen [141, 150] und durch entkoppelnde Wirkung auf eNOS [151]. Proinflammatorisch wirkt 20-HETE durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [152], der Proteinkinase C [141] und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [153], womit auch eine pro-apoptotische Wirkung einhergeht. Die Förderung der Salzausscheidung durch 20-HETE wird durch Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase der proximalen Tubuli und der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Kotransporter im aufsteigenden Zweig der Henle-Schleife vermittelt. Zusammen mit der Autoregulation der Nierenperfusion durch 20-HETE [154], könnten damit die protektiven Effekte von 20-HETE bei I/R-Schaden zu erklären sein, wie sie insbesondere im Modell Salz-sensitiver Ratten beobachtet werden [155]. Weniger kontrovers ist der Forschungsstand zur Rolle der EETs bei renalem I/R-Schaden. Die in Abbildung 4-2 gezeigte anti-apoptotische, vasodilatorische und anti-inflammatorische Wirkung wurde vielfach und einhellig beobachtet (vgl. Abschnitt 1.4). EETs

gelten als wichtiger Hyperpolarisationsfaktor, indem vom Endothel gebildete EETs die Calcium-aktivierten Kalium-Kanäle vaskulärer Glattmuskelzellen aktivieren [156] und sie fördern zudem die NO-Bildung [136, 137]. Sie inhibieren NF- $\kappa$ B [157], aktivieren PPAR $\alpha$  ebenso auch wie 20-HEETs [158, 159], sie aktivieren anti-apoptotische Kaskaden über PI3K/Akt beziehungsweise ERK1/2 [141, 160, 161]. EETs hemmen die Salz-Reabsorption in proximalen und distalen Tubuli durch Inhibition von Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschern [52], 11,12-EET ist zudem ein potenter Inhibitor epithelialer Natriumkanäle [162].

Wie aus Abbildung 4-2 hervorgeht, gibt es geschlechtsspezifische Einflüsse auf Bildung und Abbau der CYP-Eicosanoide. Frauen und weibliche Tiere besitzen in vielen Fällen einen besseren natürlichen Schutz vor I/R-Organschaden als Männer [120, 121], was auch auf kalte I/R bei Nierentransplantation zutrifft [163]. In die I/R-Untersuchungen an Ratten-Nieren dieser Arbeit, wurden deshalb beide Geschlechter einbezogen. Während in der Ischämiephase keine klaren Unterschiede bezogen auf das CYP-Eicosanoidprofil erkennbar sind (weder *in vivo* noch *ex vivo*), zeigen sich bei weiblichen Tieren stark erhöhte Level freier wie auch totaler EETs nach zwei Stunden Reperfusion *in vivo*, was auf eine verstärkte EET-Neusynthese hindeutet (vgl. Abbildung 3-5). Auch die Bildung der 20-HEETs fiel bereits in der Ischämiephase stärker aus (siehe Abbildung 3-13). Unveröffentlichte Daten früherer, unter gleichen Bedingungen durchgeführter Versuche zeigen deutlich niedrigere Plasma-Kreatininwerte und weniger tubuläre Apoptose der Weibchen nach zwei Tagen Reperfusion, verglichen mit männlichen Ratten. Die Ursache für die Geschlechtsspezifität ist nicht nur in der Androgen-stimulierten 20-HETE-Bildung [164, 165] zu suchen. Abbildung 4-2 zeigt auf, dass Östrogen unmittelbar Einfluss auf die Präsenz von Monoepoxiden nimmt, indem auf Transkriptionsebene einerseits sEH inhibiert [166, 167] und andererseits Monoepoxygenasen aktiviert werden [168], etwa CYP2C9 und 2C7 [167]. Zusätzlich stimuliert Östrogen die NO-Bildung [169]. Die geringere Inzidenz ischämischer Herz-Kreislauf-Erkrankungen für Frauen könnte auf die Wirkung von Östrogen über die genannten Mechanismen zurückgeführt werden [167], konkret für die Niere fehlt eine solche Verbindung jedoch. Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte kein reduziertes Level von DHETs bei I/R-Schaden an Nieren weiblicher Ratten im Vergleich zu Männchen festgestellt werden. Es bleibt somit offen, welcher Mechanismus der östrogen-vermittelten Beeinflussung des I/R-Schadens in Nieren ausschlaggebend ist. Weitere Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen Östrogenen, CYP-Eicosanoiden und I/R-Schaden sind die Beobachtungen, dass von CYP-Eicosanoiden regulierte Proteinkinasen wie PI3K oder MAP-Kinasen, sowie die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und weitere Enzyme auch einer sexualhormonabhängigen Kontrolle [170] unterliegen. Eine sex-spezifische Beeinflussung des I/R-Schadens wurde auch abhängig von  $\gamma$ -Aminobuttersäure beschrieben [171], deren Regulation bei Ischämie AA-Eicosanoid-abhängig erfolgt [172].

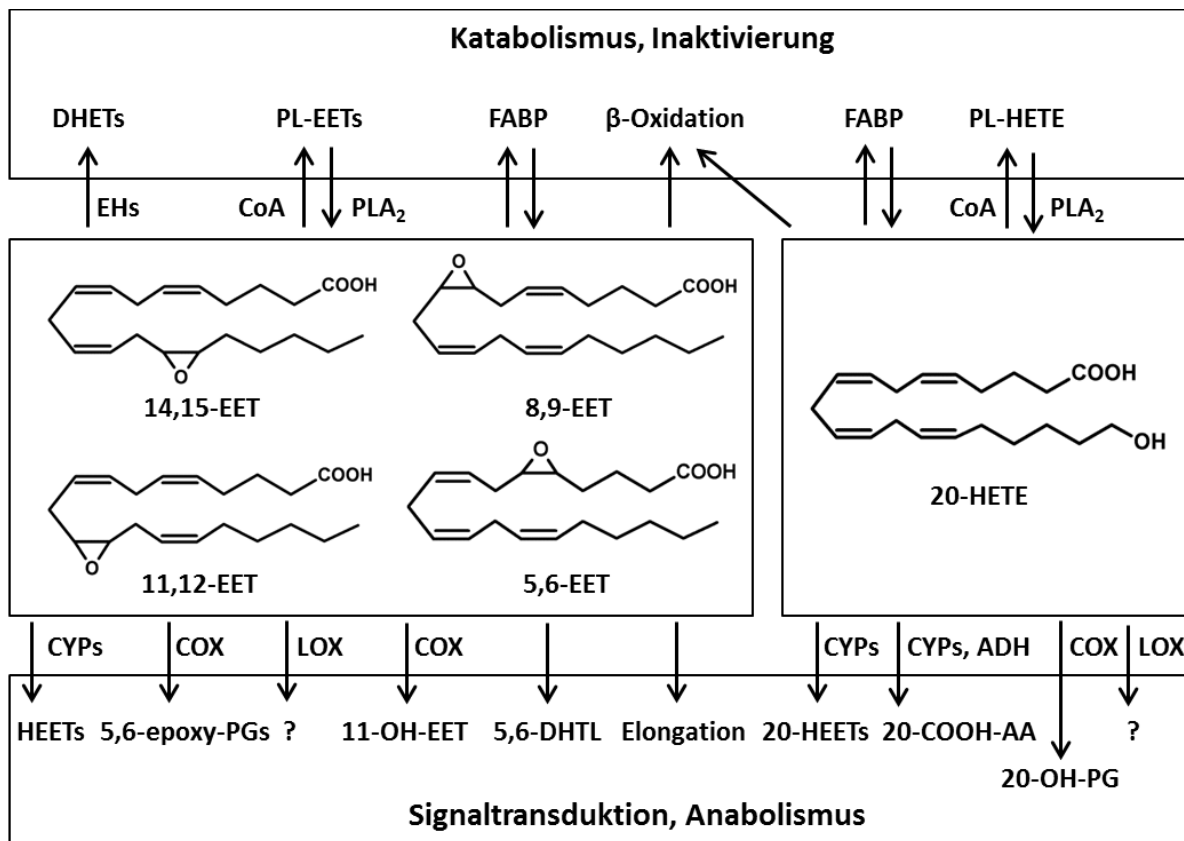
Ein bemerkenswerter, geschlechtsspezifischer Aspekt der Wirkbeziehung von EETs und 20-HETE bei I/R-Schaden zeichnet sich bei sEH-Knockout im Mausmodell ab (vgl. Kapitel 3.1.4). Obwohl die sEH-Expression zweifelsfrei global ausgeschaltet ist, weist die KO-Gruppe nach UNX

und I/R der verbliebenen Niere überraschenderweise einen stärkeren Organschaden auf [123]. Dazu passend, ergibt die Analyse der basalen Eicosanoide in der Niere kaum erhöhte EET-Level im Knockout. Die außerdem kaum veränderten DHET-Level lassen sich möglicherweise anhand der vor allem unter physiologischen Bedingungen unterschätzten Rolle der mEH erklären, siehe Kapitel 4.3. Weiterhin ergeben sich signifikant höhere basaler 20-HETE-Level in Nieren der KO-Gruppe, die den stärkeren I/R-Schaden erklären könnten. Der Befund bestätigt sich anhand von Expressionsanalysen, die eine verstärkte renale Bildung der Monohydroxylase CYP4a12a im Knockout aufzeigen. Wie aus Abbildung 4-2 hervorgeht, wird die Regulation von 20-HETE auch durch Androgene beeinflusst. Diese wirken in der männlichen Mausniere stimulierend auf die Expression von CYP4a12a [164, 165]. Unklar bleibt jedoch, warum der Knockout eine weitere Steigerung der Genexpression bewirkt, zumal im Plasma männlicher sEH-KO-Tiere eher niedrigere Testosteronlevel gemessen wurden [173].

#### **4.1.4 Sekundärmetabolismus beeinflusst endogene Level und die biologische Wirkung primär gebildeter CYP-Eicosanoide**

Endogene Vorkommen primärer Metaboliten werden häufig als Abbild einer Bildungs- oder Freisetzungstätigkeit interpretiert. Jedoch unterliegt auch der Sekundärmetabolismus einer spezifischen pathophysiologischen Regulation. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf die Relevanz mehrerer Wege des Sekundärmetabolismus‘ von CYP-Eicosanoiden bei I/R-Schaden hin. In der Metaboliten-Analytik wurden einerseits von Epoxid-Hydrolasen gebildete Diole, wie auch CYP-abhängig gebildete Hydroxyepoxy-Eicosanoide (HEETs) und deren vizinale Diole (THETs) berücksichtigt. Grundsätzlich kommen noch weitere Wege infrage, die im Folgenden ebenfalls diskutiert und in Abbildung 4–3 veranschaulicht sind. Epoxid-Hydrolasen sind potentiell auch unter hypoxischen Bedingungen aktiv, da für die Hydrolyse kein molekularer Sauerstoff benötigt wird [33]. Dagegen erfordert die weitere Metabolisierung von 20-HETE durch CYPs und COX molekularen Sauerstoff [23, 27, 174]. Im Modell der uninephrektomierten Ratten wie auch der IPK zeigt sich in der vorliegenden Arbeit tatsächlich, dass die totalen Level von 8,9-, 11,12- und 14,15-DHET im Gegensatz zu den EET- und 20-HETE-Level während der Ischämiephase deutlich ansteigen. Anders verhält sich 5,6-DHET, das jedoch nicht in freier Form auftritt. Zumindest die zusätzlich gebildeten DHETs haben demnach ihren Ursprung in EETs, die während der Ischämiephase freigesetzt, jedoch sogleich rapide durch Hydrolasen abgebaut werden. Mechanistisch bleiben wichtige Fragen offen. Einerseits passt die scheinbar bevorzugte Hydrolyse von 11,12-EET nicht zur Regiospezifität der sEH [36], andererseits bleibt unklar, warum die sEH-KO-Tiere der vorliegenden Arbeit kaum verringerte endogene DHET-Level aufweisen, obwohl *EPHX2* nachweislich global ausgeschaltet war. Die Einbeziehung der bisher in diesem Zusammenhang nur wenig beachteten mEH (*EPHX1*) [34] erschien daher sinnvoll, wobei die Beschreibung deren Regio- und Stereoselektivität Grundlage zur Erkennung der biologischen Relevanz darstellt, siehe Abschnitt 4.3.





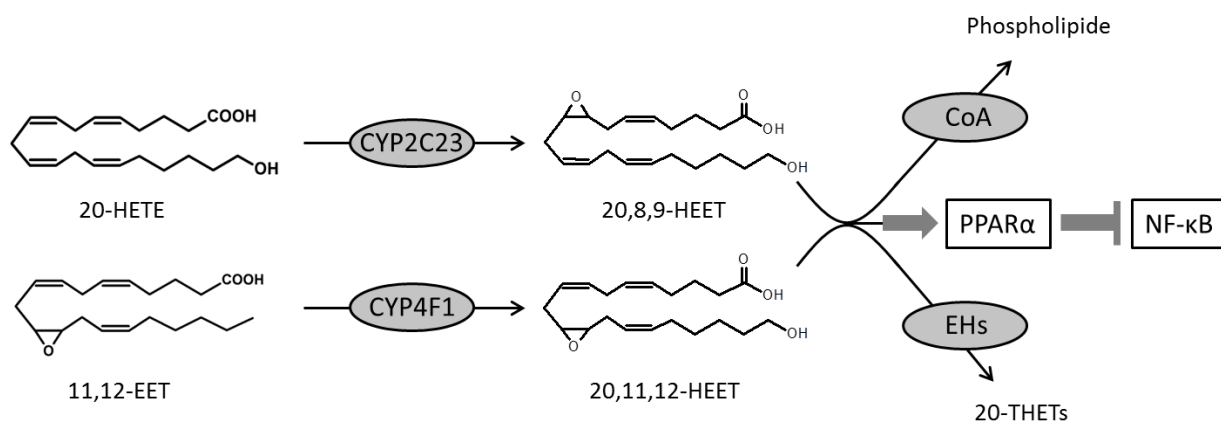
**Abbildung 4-3 Wege des Sekundärmetabolismus‘ der CYP-AA-Eicosanoide**

EETs und 20-HETE als primäre CYP-Metaboliten werden auf verschiedenen Wegen zu sekundären biologisch aktiven Eicosanoiden umgesetzt, wobei sowohl CYPs als auch LOX und COX eine Rolle spielen können. Dicarbonsäuren von 20-HETE werden alternativ auch durch Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) gebildet. Die Inaktivierung der Eicosanoide erfolgt durch Epoxid-Hydrolasen (EHs), wobei die vicinalen Dirole in Ausnahmefällen auch biologisch aktiv sein können, oder durch ATP- und Coenzym A-abhängige Veresterung in Membranen, sowie durch Bindung an Fettsäure-Bindeproteine (FABP) und letztlich auch durch  $\beta$ -Oxidation in Peroxisomen oder Mitochondrien.. Teilweise werden Eicosanoide auch dem Anabolismus in Form weiterer Kettenverlängerung zugeführt. Nicht dargestellt sind subterminale HETEs, aus denen sich weitere Stoffwechselprodukte ergeben können. Für CYP-Eicosanoide anderer Fettsäuren wie LA, EPA oder DHA sind ähnliche Kaskaden beschrieben.

Ein zweiter Weg des Sekundärmetabolismus‘ von EETs und 20-HETE ist die CYP-abhängige Bildung von 20-HEETs. Endogene Vorkommen wurden bisher kaum untersucht, obwohl 20-HEETs mit teilweise großer Enzymaktivität gebildet [24, 159, 175] werden und als hochaffine Aktivatoren von PPAR $\alpha$  beschrieben sind [159]. Dabei treten, wie diese Arbeit aufzeigt, die Regioisomere 20,8,9- und 20,11,12-HEET zusammengefasst mit ihren vizinalen Diolen sowohl in Rattennieren als auch in humanem Plasma in Mengen endogen auf, die mit den Level von 20-HETE vergleichbar sind. Damit konnte deutlich gemacht werden, dass 20-HEETs tatsächlich das Produkt eines biologisch relevanten Weges des CYP-Eicosanoid-Sekundärmetabolismus‘ sind. Wie Abbildung 4-4 aufzeigt, kann die Bildung der 20-HEETs sowohl aus EETs als auch 20-HETE erfolgen. Auf Ebene der mRNA analysiert, ist in der Niere männlicher Ratten CYP2C23 vor CYP2C24 und CYP2C11 die am stärksten

exprimierte Monoepoxygenasen [176], während CYP2C23 in der Leber auch, jedoch weniger stark als CYP2C11 exprimiert wird – wobei zu beachten ist, dass die Expression von CYP2C11 sexspezifisch für männliche Ratten ist [177].

Die endogenen Vorkommen von 20,8,9-HEET in Männchen und Weibchen lassen sich mit der stark ausgeprägten Regioselektivität von CYP2C23 bei der Epoxidation von 20-HETE erklären [23]. 8,9-EET kann jedoch auch von CYP4A1 in erheblicher Menge hydroxyliert werden [159]. Das Enzym stellt die bedeutendste Monohydroxylase in Ratten dar [178] und ist wahrscheinlich für die endogene Bildung von 20,11,12-EET verantwortlich, siehe Abbildung 4-4. In biologischen Proben scheinen demnach beide Bildungswege dieser Sekundärmetaboliten in Rattennieren wie auch humanem Plasma von Bedeutung zu sein, dies wurde bereits für die Aktivität von Ratten-Nierenmikrosomen gezeigt [23], dabei ließ sich auch eine Blutdruck-abhängige Regulation der HEET-bildenden CYPs erkennen. Auch für die biologischen Vorkommen von 20,8,9- und 20,11,12-HEET in humanem Plasma sind entsprechende CYPs beschrieben: Für CYP4F2, 4F3 und Lebermikrosomen ist die Bildung von 20,8,9- und 20,11,12-HEET aus EETs gezeigt worden [179], auch die Epoxygenasen 2C8, 2C9 und 2C19 bilden die genannten Regioisomere mit größerer Aktivität als EETs aus AA [24]. Die *in vivo*- und IPK-Versuche an ischämischen Rattennieren in dieser Arbeit, zeigen einen Ischämie-bedingten Anstieg der 20,8,9- und 20,11,12-HEET-Level. 20-HEETs wirken demnach möglicherweise nicht nur als Verstärker der bei I/R-Schaden protektiven EET-Wirkung, sondern gleichzeitig auch als Weg der



**Abbildung 4-4 Postuliertes Schema möglicher Bildung, Wirkung und Inaktivierung endogener 20-HEETs in Ratten**

Dargestellt ist ein postuliertes Schema der Hauptbildungswege endogen vorkommender 20-HEETs in Rattennieren. Die wichtigsten CYPs 2C23 und 4F1 tragen demnach in entscheidendem Maße zur Bildung der endogen vorkommenden 20,8,9- und 20,11,12HEET bei. Das Schema stellt eine Vereinfachung dar, 20,8,9-HEET kann alternativ möglicherweise auch von CYP4F1 aus 8,9-EET gebildet werden, zudem bildet die Monohydroxylase zu geringerem Anteil auch 19-HEETs. Weitere, jedoch in geringerem Umfang und teilweise geschlechtsspezifisch exprimierte CYPs wie 2C11, 4F2 und 4F3 können zur HEET-Bildung beitragen (nicht dargestellt). 20-HEETs wirken als starke PPAR $\alpha$ -Aktivatoren und lösen somit unter anderem durch darauffolgende Hemmung von NF- $\kappa$ B eine antiinflammatorische biologische Wirkung aus. Analog zu den EETs, werden wahrscheinlich auch 20-HEETs durch Epoxid-Hydrolasen zu vizinalen Diolen (THETs) hydrolysiert, die endogen in erheblicher Menge auftreten. Weiterhin können 20-HEETs vermutlich durch Coenzym A in Phospholipiden verestert gespeichert werden.

Inaktivierung von freiem 20-HETE. 20-HEETs werden während der Ischämie den vorliegenden Ergebnissen zufolge auch aus Membranen freigesetzt, die totalen Level sinken in dieser Phase ab. Die 20-HEET-Wirkung scheint demnach nicht nur auf der unmittelbaren Modulation der 20-HETE und -EET-Level, sondern auch auf der Freisetzung gespeicherter Metaboliten zu fußen. I/R-Studien im IPK-Modell mit CYP-spezifischen Inhibitoren oder *in vivo* mit CYP-Überexpressionsstämmen könnten dazu beitragen, einerseits den Anteil der 20-HEET-Bildungswege aus EETs und 20-HETE, und andererseits die Bedeutung dieser Wege unmittelbar während I/R im Vergleich zur Freisetzung gespeicherter Vorkommen aus Membranen aufzuklären.

Eine differenzierte Betrachtung des Sekundärmetabolismus‘ erscheint in Bezug auf die Regioisomere der EETs erforderlich. Schon die protektiven Wirkung der EETs bei ischämischem Organschaden ist nicht einheitlich zu bewerten. Diese ist so deutlich lediglich 11,12-EET und 14,15-EET zuzuschreiben, die keine Substrate für COX darstellen [180], zudem scheint wie bereits dargestellt, 11,12-EET zumindest in Ratten der Haupt-Precursor endogener HEETs zu sein. Sekundärmetabolismus durch COX kann bei 8,9-EET die Bildung von Metaboliten zufolge haben, deren Wirkung entgegengesetzt zu den EETs selbst ist, siehe Abschnitt 4.1.2.

Noch diverser erscheint die Rolle von 5,6-EET. Auch davon treten prädiktiv erhöhte Level bei Herz-OP-Patienten mit postoperativer AKI auf. Wegen des komplexen Sekundärmetabolismus‘ bleibt die Ursache dafür jedoch weitgehend unklar. 5,6-EET wird von COX zu einem Endoperoxid zyklisiert, aus dem in der Folge unter anderem 5,6-epoxy-PGE<sub>2</sub> gebildet wird. Zur Wirkung COX-abhängiger Sekundärmetaboliten von 5,6-EET gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Beispielsweise wurde in der Niere sowohl ein vasokonstriktiver [144] als auch vasodilatatorischer [181] Effekt beobachtet. In beiden Arbeiten wurde eine Besonderheit des EET-Regioisomers – dessen Instabilität und Neigung zur Bildung eines  $\delta$ -Lacton-Isomers (5,6-DHTL) – nicht berücksichtigt, wie sich später herausstellte [182]. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit legt nahe, dass 5,6-EET auf diese Weise seine vasodilatatorische Wirkung entfaltet und die Bildung von 5,6-DHET *in vivo* weder auf Epoxid-Hydrolasen noch spontane Degradation, sondern vorwiegend auf die Lactonase Paraxonase 1 zurückgeht [183]. 5,6-EET wirkt somit mechanistisch anders als andere EETs, und die Interpretation endogener 5,6-EET- und -DHET-Level erfordert Analysen von 5,6-DHTL wie auch sekundärer COX-Metaboliten.

Schließlich unterliegt auch 20-HETE einem Sekundärmetabolismus, der über Degradation oder 20-HEET-Bildung hinausgeht. Wiederholt wurde der COX-abhängige Metabolismus von 20-HETE zu entsprechenden Prostaglandinen und Thromboxanen beschrieben, siehe Abschnitt 4.1.2. Ebenfalls nur wenig Beachtung wurde der weiteren Oxidation der Hydroxylgruppe von 20-HETE über das Aldehyd zur 20-COOH-AA geschenkt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei *in vitro* -Versuchen mit 20-HETE-bildenden Enzymen wie CYP4a12a stets das enzymabhängige Auftreten der Dicarbonsäure zeitlich verzögert zur 20-HETE-Bildung beobachtet (Daten nicht gezeigt). In der Literatur ist eine diterminale Säurebildung aus n-Alkanen für Enzyme der CYP52-Familie der Hefen

aufgezeigt worden [184]. Auch für humane CYPs wie 4F3B ist die Fähigkeit terminaler Oxidation zur Säure beschrieben [185]. Weiterhin können Alkohol-Dehydrogenasen diese Reaktion katalysieren und scheinen für Vorkommen von 20-COOH-AA im Gehirn verantwortlich zu sein [186]. Neben der Bedeutung für den Katabolismus oder auch Anabolismus gibt es Hinweise auf biologische Aktivität, die jener von 20-HETE ähnelt, jedoch nicht identisch ist. Beispiele sind die Modulation von Ionenkanälen wie der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in der medullären Niere [187], sowie Aktivierung von PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  [185]. Endogene Level von 20-COOH-AA in biologischen oder klinischen Proben wurden nur selten bestimmt, dabei scheint der Metabolit in eher größerer Menge als 20-HETE vorzukommen. Bei gesunden Probanden wurden frei vorliegend im Plasma 7,5 pmol/ml und bei Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis 38 pmol/ml gemessen, während freies 20-HETE jeweils unterhalb des LLOQ lag [188]. Es ist daher naheliegend, dass eine Modulation der 20-COOH-AA-Bildung erhebliche Auswirkung auf die endogenen 20-HETE-Vorkommen hat.

Eine weitere Kaskade des Sekundärmetabolismus ergibt sich vermittelt durch LOX. Dieser Weg ist in Bezug auf CYP-AA-Eicosanoide kaum erforscht. Beschrieben wurde die Metabolisierung von 16-18-HETE durch 15-LOX, wobei die Stereospezifität und Enzymaktivität abnehmend waren mit zunehmender Annäherung der Hydroxylgruppe an die terminale Position [189]. Für EPA-abgeleitete CYP-Eicosanoide ist die Bildung von E-Resolvinen aus 18-HEPE durch 5-LOX und 15-LOX, wie auch die 12(*S*)-OH-17,18-EEQ – Bildung aus 17,18-EEQ durch 12-LOX beschrieben, diese Metaboliten sind biologisch zudem hochaktiv [190]. Der Sekundärmetabolismus der Re-esterifizierung von Eicosanoiden in Membranen, sowie deren Bindung an Fettsäure-Bindeproteine (FABP) werden in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ischämischer Nierenschaden abhängig vom Profil endogener CYP-Eicosanoide moduliert wird, wobei die Bioverfügbarkeit von EETs in deutlichem Zusammenhang mit einer Protektion vor I/R-Schaden steht und sexspezifisch wie auch durch NO beeinflusst wird. Weiterhin konnten in einer klinischen Studie 20-HETE und 8,9-EET mit dem Auftreten von AKI nach offenen Herz-Operationen assoziiert werden. Der Sekundärmetabolismus hat auf die Regulation der CYP-Eicosanoide eine entscheidende Bedeutung. Neben CYP- und COX-abhängigen Kaskaden erscheint insbesondere die Hydrolyse von Monoepoxiden zu Diolen ein zentraler Weg der Eicosanoid-Regulation zu sein, der nicht nur durch sEH vermittelt wird, wie sich aus den endogenen Vorkommen von vizinalen Diolen der Monoepoxide in sEH-Knockout-Mäusen ergab. Methodische Voraussetzungen für stereochemische Analysen zu schaffen, die hierzu Aufklärung bringen können, ist Gegenstand des folgenden Kapitels.

## **4.2 Etablierung, Optimierung und Validierung chiraler**

### **Eicosanoid-Analytik**

Ein Hauptergebnis dieser Arbeit ist die erstmalige Etablierung eines hochsensitiven analytischen Verfahrens, das die chirale Analyse von Enantiomeren sowohl der Monohydroxyde als auch Monoepoxide zahlreicher AA, EPA und DHA-abgeleiteter Eicosanoide in biologischen Proben mittels Chiralphasen-LC-ESI-MS/MS ermöglicht. Die moderate Laufzeit der Gradienten von weniger als 30 min eröffnet die Möglichkeit der routine-mäßigen, stabilen und reproduzierbaren Anwendung des validierten Verfahrens auf biologische Fragestellungen (vgl. Abschnitt 4.3).

Die spezifische und oft sehr unterschiedliche biologische Rolle der Eicosanoide geht nicht nur auf deren verschiedene Stoffklassen und Regioisomeren zurück, sondern ist auch hochgradig stereospezifisch, siehe Abschnitt 1.5. Für CYP-abhängige Eicosanoide ist dieser Aspekt von besonderer Bedeutung, da anders als bei LOX- und COX-abhängig gebildeten Metaboliten beide Enantiomere eines Enantiomerenpaares in erheblicher Menge auftreten und diese sich ebenso in ihrer biologischen Wirkung unterscheiden. Für eine chirale Analytik sowohl von Monoepoxy- als auch Monohydroxy-Eicosanoiden – noch dazu sensitiv und selektiv genug um endogene Enantiomere in komplexer biologischer Matrix zu messen – lag bisher keine Methode vor, was eine Limitation der insgesamt bereits gut etablierten Eicosanoid-Analytik [96, 97] darstellte.

Die in dieser Arbeit vorgenommene Kombination der zwei chiralen Säulen Lux-Amylose-1 und Lux-Cellulose-3, jeweils gekoppelt mit einer kurzen achiralen Phase, ergibt abgestimmt auf geeignete Organikanteile des jeweiligen Laufmittels ein Verfahren, mit dem sämtliche bisher untersuchten chiralen Eicosanoid-Analyten chromatografisch mit praktikablem Zeitaufwand aufgelöst werden können. Die Methode könnte demnach bei Bedarf auf noch eine Vielzahl weiterer chiraler Eicosanoide erweitert werden. Die Verwendung von wässrigen Laufmitteln ermöglichte eine direkte Kopplung mit hochsensitiver [191] ESI-MS/MS. Die Kombination aus großer Sensitivität des MS-Betriebsmodus mit optimierter chromatografischer Auflösung der ionisierbaren Probenbestandteile ermöglichte schließlich die Analytik der Enantiomere auch in geringen endogenen Konzentrationen innerhalb komplexer biologischer Matrix. Auf die besondere Anforderungen chiraler Chromatografie abgestimmt, wurde die Validierung einer Variante des Verfahrens durchgeführt, die zur verbesserten Routine-Anwendung auf maximal 30 min verkürzte Gradientenlaufzeiten und lediglich eine Auswahl der chiralen Eicosanoide beinhaltet, die für die biologischen Fragestellungen dieser Arbeit von besonderem Interesse sind.

### **4.2.1 Validierung der Methode**

Die Validierung der Methode erfolgte orientiert an den Empfehlungen der Food and Drug Administration (FDA) [125] und an beschriebenen Validierungen von LC-MS/MS-Methoden der achiralen Eicosanoidanalytik [192-194]. Zunächst erfolgt eine Charakterisierung des Vorgehens bei der Validierung in dieser Arbeit: Um den besonderen Anforderungen der chiralen Analytik gerecht zu werden, wurden über die üblichen Parameter hinausgehend die Stabilität der Retentionszeiten, die chromatografische Auflösung von Enantiomerenpaaren, sowie eine „Akkuratesse B“ in die Validierung einbezogen, bei der sich der Referenzwert für eine Enantiomerenpaarsumme nicht aus der chiralen Analytik selbst, sondern aus einer herkömmlichen achiralen Analyse ergibt. Die Anzahl der Quality Controls (QCs) konnte im vorliegenden Fall auf drei beschränkt bleiben, da die QCs bereits auf den erwarteten individuellen linear range optimierte Konzentrationen der Analyten enthielten. Nicht berücksichtigt wurde die Überprüfung der inter-day-Akkuratesse und -Präzision der Methode, weil der dafür erforderliche Zeitbedarf die verfügbaren Kapazitäten der Lipidomix GmbH überschritten hätte. Dies sollte gegebenenfalls nachgeholt werden, weil chirale Messreihen häufig länger als 24 Stunden andauern. Die Konsequenz daraus für die Routineanwendung ist die Messung von QC-Standards spätestens alle 10 Proben, sowie gegebenenfalls das Mitführen biologischer oder klinischer Kontrollproben. Die Validierung bezog sich explizit auf die unmittelbare chirale Analytik von Extrakten – eine Validierung der Qualität von Probenaufbereitung und -Lagerung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, wäre jedoch sinnvoll im weiteren Sinne der Anwendung der Chiralphasenanalytik.

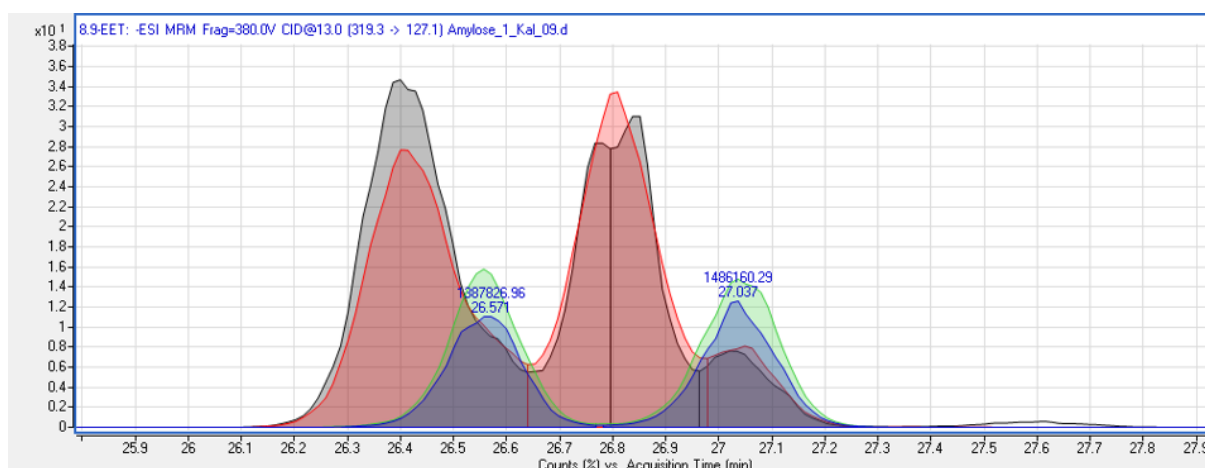
Insgesamt ergab die Validierung verglichen mit der Literatur gute bis sehr gute Ergebnisse. Die Sensitivität ist groß genug, um Eicosanoide auch im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,5 ng/ml zu quantifizieren, in dem viele Monohydroxide und omega-3-FS-abgeleitete Eicosanoide in Plasmaproben vorkommen. Die intra-day-Präzision der Methode war hervorragend. Die intra-day-Akkuratesse war für QC1 und QC2 ebenfalls gut, jedoch traten bei QC3 teilweise Abweichungen von >20% vom Erwartungswert auf, siehe Tabelle 3-11. Dies bedeutet, dass Proben mit Analyten in diesem Konzentrationsbereich zur Messung unter diesen Bedingungen verdünnt werden sollten. Obwohl in der Literatur beschrieben ist, dass bei ESI- im Vergleich zu APCI-Ionisierung Matrixeffekte verstärkt auftreten können [191], ergab die Prüfung der Matrixeffekte ein geradezu hervorragendes Bild – weder in Extrakten aus Mauselebern noch aus humanen Plasmen trat ein relevanter Matrixeffekt auf. Einschränkend ist anzumerken, dass der Effekt nicht anhand authentischer Standards und deren MRMs, sondern anhand sechs ähnlicher, deuterierter Standards überprüft wurde. Das indirekte Vorgehen bedingt sich durch die Tatsache, dass jede biologische und klinische Matrix Eicosanoide bereits endogen enthält. Andererseits konnte das Auftreten für die chirale Analytik spezifischer Matrixeffekte anhand der Summenvergleiche mit achiralen Vergleichsanalysen (Akkuratesse B) direkt ausgeschlossen werden. Die Anzahl der verwendeten internen Standards in der

Routineanwendung (15(*S*)-HETE-d8 für Monohydroxide und 8,9-EET-d11 für Monoepoxide) ist vergleichsweise knapp [195] bemessen und sollte zur Qualitätssteigerung der Analytik erweitert werden.

Von besonderer Bedeutung ist die erreichte Leistung des vorliegenden Verfahrens, die gute chromatografische Auflösung von Metaboliten mit identischen MRMs bei stabilen Retentionszeiten zu gewährleisten. An diese beiden, in die Validierung einbezogenen Parameter stellt die Chiralphasenanalytik vergleichsweise hohe Anforderungen, da sich Stereoisomere massenspektrometrisch nicht unterscheiden lassen – deren Trennung somit allein von der Chromatografie geleistet werden muss. Durch ein sorgfältiges Säuleneinlauf-Regime [124] konnten sehr gut reproduzierbare Retentionszeiten innerhalb eintägiger Messreihen erreicht werden. Möglich wurde dies nicht zuletzt durch Vermeidung von Normalphase-Laufmitteln wie Hexan, die den Erfahrungen mit NP-Chromatografie nach (vgl. Abschnitt 2.4) keine stabilen Retentionszeiten ermöglichen. Für die Methodenetablierung wurde deshalb von Anbeginn der Weg der Chiralphasen-NP-LC-APCI-MS [98, 99] nicht berücksichtigt, sondern stets ein wässriges Laufmittel verwendet. Die chromatografische Auflösung von korrespondierenden Enantiomeren der Methode ist mit  $R_s > 1,5$  im Allgemeinen hervorragend, was im Wesentlichen durch die Auswahl entsprechender chiraler Säulen und geeigneter Organik-Anteile im Laufmittel erreicht wurde. Bei der angewendeten Gradienten-Laufzeit von 30 min ergab sich für die Analytik auf dem System Amylose-1 eine Einschränkung für die Auflösung einiger Enantiomerenpaare (19-HETE, 11,12-EEQ und 13,14-EDP) mit  $R_s > 0,6$ , diese konnten aufgrund der guten Sensitivität und Retentionszeitstabilität in biologischen Proben dennoch sicher bestimmt und quantifiziert werden. Eine noch wesentlich verbesserte Auflösung dieser Analyten ist durch eine mäßige Verlängerung der Gradienten-Laufzeit erreichbar, wie die Vorversuche an der Singlequad-MS aufzeigen (vgl. Abbildung 3-19).

#### **4.2.2 Methodenspezifische Probleme und deren Lösung**

Eine Herausforderung, die im Zuge der Methodenentwicklung bewältigt wurde, ist die Schwäche der verwendeten chiralen Säulen, Metaboliten achiral zu trennen und so eine gute Auflösung von Regioisomeren oder auch Monohydroxiden und Monoepoxiden zu erreichen. Dies ist wichtig, da nicht alle MRMs spezifisch für die jeweiligen Analyten sind, sondern in mehr oder minder starker Weise von Fragment-Ionen anderer Eicosanoide mit identischer Molekülmasse gestört werden können. Mitunter konnten sich auf den chiralen Phasen selbst EETs und HETEs auf diese Weise stören. Das Problem wurde durch die Kopplung mit kurzen achiralen Säulen erfolgreich beseitigt, siehe Abbildung 3-21. Dennoch ergeben sich auch im etablierten Verfahren bei Betrachtung der Retentionszeiten der verschiedenen Analyten nach wie vor viele Koelutionen von Regioisomeren, siehe Tabelle 3-9 und 3-10. Dies ist eher unproblematisch, solange die jeweiligen Analyten in der MS/MS individuelle MRMs ergeben, die zur sensitiven und spezifischen Quantifizierung herangezogen werden können. Für eine mögliche Überlagerung in der MS/MS-Analytik sind 8,9- und



#### Abbildung 4-5 Potentielle Störung der MS/MS-Analytik bei Regioisomeren

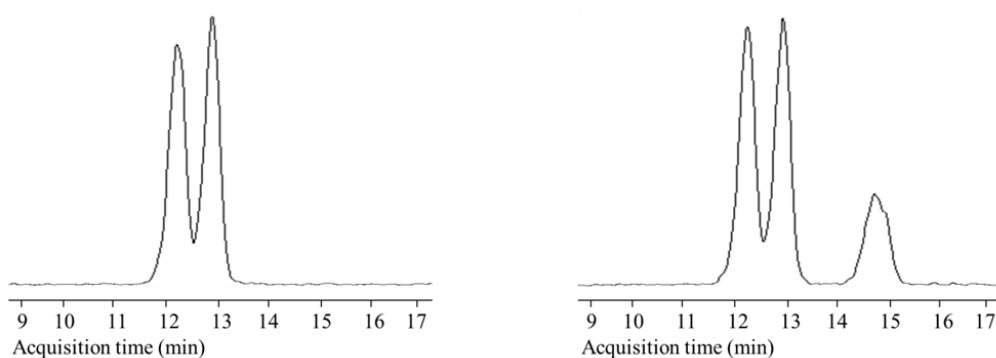
Eicosanoide mit identischer Molekülmasse weisen in einigen Fällen kein individuell charakteristisches Fragment-Ion in ausreichender Intensität auf. Zu einer Störung kommt es, wenn sich die Retentionszeiten solcher Metaboliten mit ähnlichen Fragment-Ionen nicht deutlich unterscheiden. Dargestellt ist die potentielle Störung der 11,12-EET-Analyse durch das Regioisomer 8,9-EET im chiralen Amylose-System. Die 11,12-EET-Enantiomere werden anhand des Quantifiers 167 bei CE = 11 (grau) und des Qualifiers 179 bei CE = 9 (rot) gemessen. Die Chromatogramme zeigen die Analyse eines äquimolaren Gemischs aus 11,12-EET und 8,9-EET. Für beide Fragmente 167 und 179 ist eine Schulter rechts an den Peaks zu erkennen, die sich auf die Gegenwart von 8,9-EET zurückführen lässt, wie die Messung der für 8,9-EET charakteristischen Fragmente 155 bei CE = 7 (grün) und 127 bei CE = 13 (blau) aufzeigt. 8,9-EET wird im Amylose-System zwar regulär nicht gemessen, jedoch kann der gezeigte Effekt zu Messunsicherheiten führen, wenn Proben analysiert werden, die sowohl 11,12- als auch 8,9-EET enthalten.

11,12-EET bekannt, die teilweise dieselben Fragment-Ionen bilden und chromatografisch nur mäßig trennbar sind. Das Problem tritt analog auch bei der LC-MS/MS-Analyse von 20,8,9- und 20,11,12-HEET auf [24]. Kritisch ist insbesondere das 11,12-Regioisomer, das kein spezifisches Fragment-Ion in einer Intensität bildet, die hinreichend für einen geeigneten Quantifier wäre. Abbildung 4-5 veranschaulicht die Situation während der 11-12-EET-Analyse in Gegenwart von 8,9-EET bei äquimolarer Konzentration. Daraus ergibt sich, dass unter den gegebenen Messbedingungen immerhin eine mäßige chromatografische Trennung der vier Enantiomere gewährleistet ist, die Fragmente 167 und 179 zur Quantifizierung und Qualifizierung von 11,12-EET allerdings wie zu erwarten potentiell durch 8,9-EET gestört werden. Dies macht die Wichtigkeit großer Retentionszeitstabilität deutlich. Zwar fällt die Intensität der Fragment-Ionen 167 und 179 für 8,9-EET vergleichsweise gering aus, dennoch ist von einem nicht zu vernachlässigenden Störfaktor auszugehen, der sich etwa in Gestalt einer schmalen Schulter nicht klar vom 11,12-abhängigen MRM unterscheiden lässt. Für eine Optimierung der Analytik sollte dieses Risiko beseitigt werden, indem entweder die Auflösung der Peaks verbessert oder aber ein alternatives MRM für 11,12-EET ausgewählt wird. In der Literatur ist das Problem aus achiralen Methoden bekannt [196], die vorgeschlagene Quantifizierung von 11,12-EET mittels des Fragments 208 erscheint jedoch aufgrund ebenfalls auftretender Störungen bei deutlich schlechterer Sensitivität wenig plausibel. Ein alternativer



Lösungsweg ist die Korrektur gestörter MRMs durch eine Gleichung mit zwei Unbekannten [24]. Umgekehrt spielt das Problem bei der Analyse von 8,9-EET im chiralen Cellulose-System keine Rolle, da für die 8,9-EET-Enantiomere die Fragment-Ionen 127 und 155 herangezogen werden, die bei 11,12-EET unter den gegebenen Messbedingungen nicht auftreten. Um die Qualität der Analytik weiter zu optimieren, können sämtliche biologisch auftretenden Metaboliten mit gleicher Molekülmasse in die Untersuchung einbezogen werden. So wäre beispielsweise auch eine Prüfung sinnvoll, ob das MRM eines der 19-HETE-Enantiomere durch das achirale 20-HETE gestört wird [196].

Ein weiteres Risiko für Fehlbestimmungen geht von *trans*-Isomeren der Monoepoxide aus, die ebenfalls dieselben MRMs aufweisen. In ihrem Charakter als Diastereomere unterscheiden sie sich von den *cis*-Isomeren nicht nur chemisch sondern auch physikalisch (vgl. Abschnitt 1.5), sodass eine chromatografische Trennung potentiell bereits mit achiralen Methoden gelingt. Das Risiko liegt darin, dass authentische Standards der *trans*-Epoxide kommerziell nicht erhältlich sind und diese mangels geeigneter Enzyme oder chemischer Methoden auch nicht ohne weiteres im Labor präpariert und identifiziert werden können. Zudem ist das mögliche Auftreten der *trans*-Epoxide in biologischen Proben nur unzureichend erforscht. Angenommen wird, dass sie *in vivo* vorwiegend durch Autoxidation entstehen [197], jedoch können sie auch enzymatisch durch CYPs gebildet werden, wenn als Ausgangsmaterial eine *trans*-Fettsäure vorliegt [198]. In den früheren Publikationen zur LC-MS/MS-Analyse wurden die *trans*-Isoformen mit Ausnahme der Arbeiten von Houli Jiang [133, 199, 200] nicht berücksichtigt, in jüngster Vergangenheit scheinen sie jedoch zunehmend Beachtung zu finden [197, 201, 202]. Für *trans*-14,15-EET war es dank einer zur Verfügung gestellten identifizierten Synthese aus dem Labor von J.R. Falck möglich, dessen Verhalten im Cellulose-System mit dem die *cis*-14,15-EET-Enantiomere gemessen werden, direkt zu testen. Abbildung 4-6 zeigt auf, dass sich das *trans*-Isomer auch im chiralen System chromatografisch von den *cis*-Enantiomeren trennt und somit keine Störung auftritt. Bemerkenswert ist dabei, dass sich die (*R,S*)-Enantiomere der *trans*-Verbindung dabei offenbar nicht trennen. Die Feststellung ist jedoch nicht verallgemeinerbar, weitere derartige Tests wären zur Absicherung von LC-MS/MS-Analysen der Monoepoxide im Allgemeinen erstrebenswert. Die in Abbildung 3-22 gezeigten MRMs in biologischen Proben lassen bei den Monoepoxiden zeitlich etwas später eluierende Peaks erkennen, von denen der Chromatografie von *trans*-14,15-EET wie auch der Charakterisierung eines *trans*-5,6-EET-Standards nach [203] angenommen werden kann, dass es sich um abgetrennte *trans*-Isomere handelt. Neben *trans*-Isomeren an der Epoxidgruppe, können an den ungesättigten Loci potentiell noch zahlreiche weitere *trans*-Isomere der Monoepoxide und auch Monohydroxide auftreten, die zumindest teilweise in biologischen Proben vorzukommen scheinen und auch enzymatisch gebildet werden können [204]. Diese Isomere sind kaum erforscht, sie sollten perspektivisch jedoch ebenso in der Qualifizierung analytischer Methoden zur Bestimmung von Monoepoxy- wie auch Monohydroxiden in biologischen Proben Berücksichtigung finden.



**Abbildung 4-6 Potentielle Störung der MS/MS-Analytik durch *cis/trans*-Isomere**

Eicosanoide mit identischer Molekülmasse weisen in einigen Fällen kein individuell charakteristisches Fragment-Ion in ausreichender Intensität auf. Zu einer Störung kommt es, wenn sich die Retentionszeiten solcher Metaboliten mit ähnlichen Fragment-Ionen nicht deutlich unterscheiden. Die Eigenschaften der *trans*-Isomere der Monoepoxide in der LC-MS/MS-Analyse sind mangels Standards nur unzureichend beschrieben. Ein *trans*-14,15-EET-Standard konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch getestet werden. Dargestellt ist *cis*-14,15-EET im chiralen Cellulose-System, links als purer Standard, rechts gespickt mit *trans*-14,15-EET. Es tritt in diesem Fall keine Überlagerung der Retentionszeiten auf.

Noch nicht zufriedenstellend gelöst ist die Verfügbarkeit und Identifizierung enantiomerer Standardsubstanzen der Eicosanoide. Im Vorfeld der Methodvalidierung stellte sich heraus, dass kommerziell verfügbare Standards nicht immer zutreffende Konzentrationsangaben aufweisen. *Cayman Chemicals* garantiert nicht für die Korrektheit der Konzentrationsangaben, den Eicosanoid-Standards wird auch kein Dokument beigelegt, aus dem sich eine Prüfung der Konzentration ergäbe (lediglich die Reinheit wird geprüft). Um überhaupt Standards und Kalibrierlösungen erstellen zu können, war deshalb jeweils eine Prüfung der Standardkonzentrationen erforderlich, was anhand von Peakfläche-Analysen an einer Single-Quad-MS erfolgte. Als Referenz für eine authentische Konzentration dienten dabei ein als reinstes Pulver verfügbarer Standard von 20-HEPE, sowie *Lipid Maps*-Standards von Cayman, die eine höhere Gütequalität aufweisen. Basierend auf der Annahme, dass Eicosanoide mit ähnlicher Molekülmasse und ähnlicher Retentionszeit auch ähnliche Precursor-Ion-Peakflächen pro Stoffmenge aufweisen, wurde die Konzentration der Standards geprüft und gegebenenfalls korrigiert. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit bestätigt die Plausibilität dieses Vorgehens [205], dabei konnten auch einige Standards mit zertifizierter Konzentrationsangabe herangezogen werden, die Cayman seit einigen Monaten anbietet. Authentische Standards sind allgemein als wichtige Voraussetzung dafür anzusehen, überhaupt eine vergleichbare und reproduzierbare Quantifizierung von Eicosanoiden zu erreichen. Eine weitere Herausforderung dahingehend ist es, dass einige enantiomerenreine Standards kommerziell nicht erhältlich sind und vom Anwender selbst aus Racematen präpariert werden müssen, wobei die Bestimmung der Konfiguration nicht immer möglich ist. So ist etwa für CYP-Monoepoxide eine Identifizierung der Konfiguration bisher lediglich für die EETs und 17,18-EEQ erfolgt [206-208] und gestaltet sich

angesichts asymmetrischer chemischer Syntheseschritte, erforderlicher Derivatisierung zu Diastereomeren und Kernspinresonanz-Spektroskopie aufwändig. Obwohl sich aus der vergleichsweise einfach feststellbaren Änderung des Drehwinkels des polarisierten Lichts nicht direkt die Konfiguration ableiten lässt, wurde für Epoxide kürzlich eine Methode beschrieben, die mittels enantiospezifischer Epoxid-Interaktionen in molekularen Schläuchen eine direkte Identifizierung der absoluten Konfiguration mittels Circular dichroismus-Spektroskopie zuzulassen scheint [209].

Zusammengefasst ist festzuhalten, dass erstmalig eine chirale Analytik für zahlreiche Monohydroxy- und Monoepoxy-Eicosanoide mittels hochsensitiver RP-LC-ESI-MS/MS ermittelt und validiert wurde, die als ein Hauptergebnis dieser Arbeit nunmehr zur Anwendung auf biologischen Fragestellungen zur Verfügung steht.

## **4.3 Anwendung der Chiralphasen-Analytik der Eicosanoide auf biologische Fragestellungen**

### **4.3.1 Stereospezifische Rolle von CYP-Eicosanoiden**

Die Stereoselektivität der CYP-abhängigen Eicosanoidbildung wurde bereits in der Frühphase der Erforschung der CYP-Eicosanoidbildung als dritter Weg der AA-Kaskade charakterisiert [12, 210]. Enantioselektivität wurde im Zusammenhang der EET-Bildung [105, 211-213], der sEH-abhängigen EET-Hydrolyse [89] und der Re-Esterifizierung der EETs in Membran-Phospholipide [88] beschrieben. Für CYPs konnte außerdem die Katalyse der Epoxidation von EPA und DHA zu EEQs und EDPs auf regio- und stereoselektive Weise aufgezeigt werden [76, 118, 214]. Dabei zeigte sich, dass beobachtete biologische Wirkungen der Epoxide stets stereospezifisch waren. Beispiele sind die enantiospezifische vasodilatorische Antwort [83, 84], Effekte auf Ionenkanäle [82] und den  $\text{Ca}^{2+}$  Haushalt [80] in Kardiomyozyten, als auch die Induktion von cAMP-Bildung und -Signaltransduktion in Endothelzellen [81]. Unter den CYP-abhängigen Monohydroxiden ist das Produkt terminaler Hydroxylierung der verschiedenen PUFAs zwar achiral, jedoch zeigen subterminal hydroxylierte Metaboliten ebenfalls meist eine stereospezifische Wirkung, sofern diese untersucht wurde. So wirken 19(R)- als auch 18(R)-HETE vielfach als Gegenspieler des vasokonstriktiven 20-HETEs, während die (S)-Enantiomere inaktiv sind [85-87]. Epoxid-Hydrolasen modulieren die Verfügbarkeit der Monoepoxide stereospezifisch, und CYPs beeinflussen die Enantiomerenmuster verfügbarer Monoepoxide und Monohydroxide als Folge ihrer individuell ausgeprägten Stereoselektivität. CYPs und Epoxid-Hydrolasen bestimmen somit ganz wesentlich die Pathophysiologie insbesondere auch bei

ischämischem Organschaden. Die etablierte Chiralphasenanalytik wurde genutzt, um die Charakterisierung dieser Enzyme und deren Beitrag zur biologischen Verfügbarkeit und Wirkung von Enantiomeren der Eicosanoide zu erweitern.

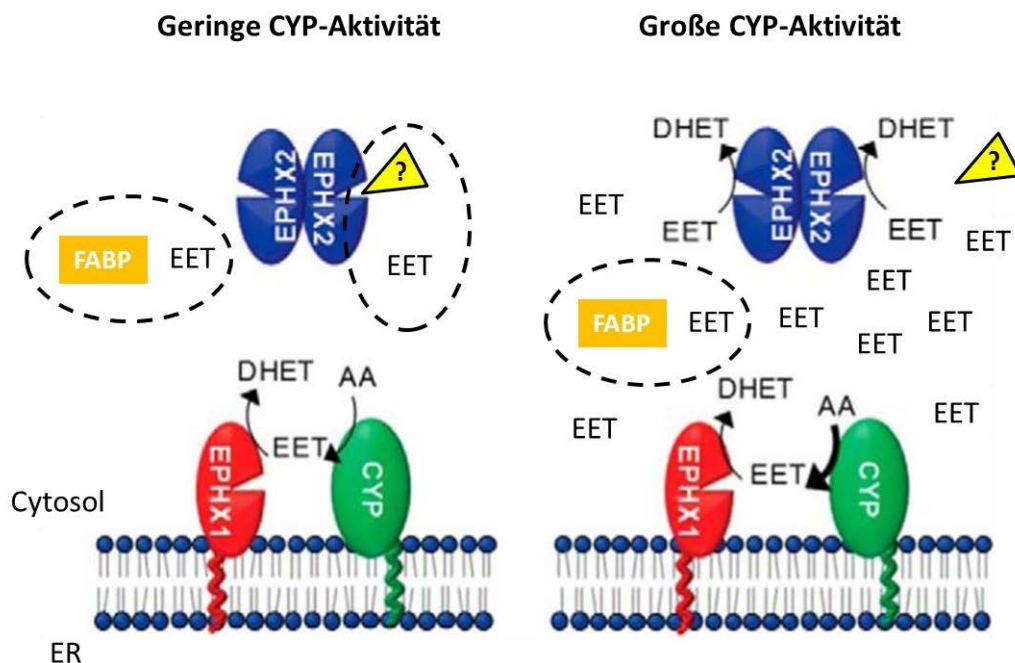
#### **4.3.2 Epoxid-Hydrolasen regulieren Monoepoxide stereospezifisch**

Zwei wichtige Ergebnisse dieser Arbeit sind die erstmalige, vergleichende Beschreibung des stereoselektiven Abbaus racemisch vorliegender Monoepoxide durch die Hydrolasen sEH und mEH, sowie das Zusammenwirken von CYPs mit mEH in Membran-Komplexen, aus dem eine größere biologische Rolle der mEH hervorgeht als bisher angenommen.

Die Bioverfügbarkeit der CYP-Monoepoxide wird in entscheidendem Maße von Epoxid-Hydrolasen reguliert und ist für die Pathophysiologie des ischämischen Organschadens von zentraler Bedeutung (vgl. Abschnitte 4.1.4, 1.4 und 1.5). Die enzymatische Hydrolyse endogener CYP-Monoepoxide wurde bisher auf die sEH (*EPHX2*) zurückgeführt. Die Aktivität der mEH (*EPHX1*) ist *in vitro* um zwei bis drei Größenordnungen niedrigerer [34], und noch geringer erscheint die Relevanz von *EPHX4* und *EPHX5* in Bezug auf die CYP-Monoepoxide [35]. Die mittels der Chiralphasenanalytik erhaltenen Ergebnisse aus Hydrolase-Inhibitions-Versuchen mit CHO und TPPU in murinen und humanen Lebermikrosomen legen in Einklang mit den kürzlich veröffentlichten Befunden aus mEH-Knockout-Modellen [34] nahe, dass die Bedeutung der mEH für das endogene Eicosanoidprofil weitaus größer ist als bisher angenommen. Für das Zusammenwirken des CYP-mEH-Komplexes wird in der erwähnten Publikation eine erhebliche und regiospezifische Beeinflussung bestimmter Monoepoxide beschrieben, und nur ein sEH-mEH-Doppelknockout ermöglicht eine weitgehende Unterdrückung der Hydrolyse zu den vicinalen Diolen in Mäusen. Unabhängig davon wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei NADPH-abhängigen Inkubationen von Lebermikrosomen mit AA und EPA beobachtet, dass sich die Hydrolyse der Monoepoxide durch sEH-Inhibitoren nur teilweise verringern lässt. Die Gegenwart des mEH-Inhibitors CHO führt zusammen mit dem sEH-Inhibitor TPPU hingegen zu einer weitgehenden Unterdrückung der Diolbildung bei kaum veränderter CYP-Aktivität (Abbildung 3-30). Monoepoxide wirken – gebildet am endoplasmatischen Retikulum (ER) – sowohl autokrin als auch parakrin, und mutmaßlich auch organismisch über das Blut. Der Leber kommt angesichts großer Expression und Aktivität von CYP-Monoepoxygenasen dabei eine besondere Bedeutung zu [215], was die Bedeutung der Befunde aus Lebermikrosomen unterstreicht. Darüber hinaus wird in dieser Arbeit auch die auftretende Stereospezifität der mEH selbst mittels der etablierten Chiralphasenanalytik erstmalig beschrieben und den Präferenzen der sEH gegenübergestellt. Bemerkenswert ist dabei, dass die Stereoselektivität der mEH im Vergleich zur sEH oft sogar gegensätzlich ist. Diese neuen Einblicke in die Rolle der mEH erlauben die Schlussfolgerung, dass Polymorphismen und Xenobiotika, die die mEH-Expression oder Aktivität verändern, einen erheblichen Einfluss auf die Präsenz bioaktiver Lipidmediatoren des CYP-

Epoxygenase-Weges haben dürften. Zudem könnte die aufgeklärte Stereoselektivität ein Schlüssel für das Verständnis der Rolle der mEH bei menschlichen Erkrankungen sein [216, 217].

Weiterhin wurde die Stereoselektivität der sEH mittels der Chiralphasenanalytik und eines sEH-Konockout-Stammes erstmalig *in vivo* untersucht. Im Lebergewebe und Plasma spiegelt sich in spezifisch höheren Level des (*R,S*)-Enantiomers von 14,15-EET, 17,18-EEQ und 19,20-EDP die *in vitro* charakterisierte sEH-Aktivität wider. Zudem wird der sEH-spezifische Effekt anhand der Analytik der einzelnen Enantiomere deutlicher erkennbar als bei der herkömmlichen Betrachtung der Regioisomere. Die Verschiebung des Enantiomerenverhältnisses wird hiermit erstmalig *in vivo* nachgewiesen und könnte potentiell förderliche Effekte einer genetischen oder pharmakologischen sEH-Inhibition wie sie in verschiedenen Tiermodellen kardiovaskulärer und inflammatorischer Erkrankungen beobachtet wurden [30, 33, 218, 219] eine weitere Erklärung liefern.

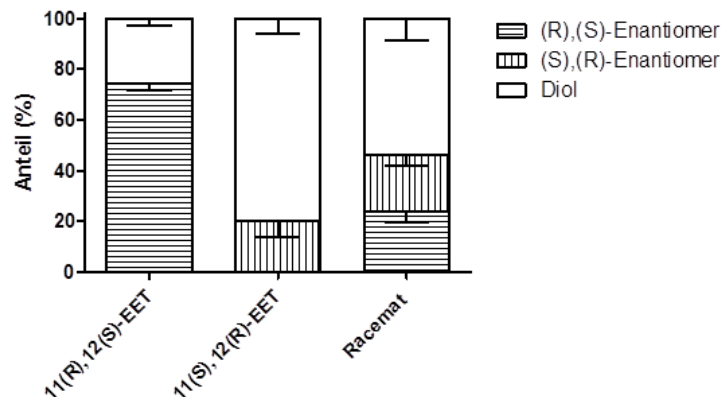


**Abbildung 4-7 Schema der intrazellulären Hydrolyse von Monoepoxiden durch sEH und mEH**

Dargestellt ist der ER-membranständige enzymatische Komplex aus einer CYP-Monoepoxygenase und mEH (EPHX1), sowie das im Cytosol vorliegende Homodimer der sEH (EPHX2). Bei geringer Substratkonzentration von beispielsweise AA, werden von CYPs vergleichsweise geringe Mengen EETs gebildet, die zum großen Teil unmittelbar durch die räumlich assoziierte mEH hydrolysiert werden. Freigesetzte EETs werden in Gegenwart von FABP vor dem Zugriff der sEH geschützt, zudem bewirken in der cytosolischen Matrix präsente alternative, langsamer umgesetzte Substrate der sEH (Dreieck) möglicherweise eine Inhibition der Enzymaktivität in Bezug auf das individuelle EET. Ist infolge eines (patho)physiologischen Signals mehr freie AA verfügbar, steigt die EET-Bildung rapide an, die begrenzte Enzymaktivität der mEH hat eine starke Freisetzung der EETs in das Cytosol zufolge, die durch FABPs nicht umfassend geschützt werden können, und alternative Substrate der sEH werden aus der Bindungstasche verdrängt. EETs werden somit in großer Menge durch sEH hydrolysiert, die Bedeutung der mEH an der Diol-Bildung verringert sich. Abbildung modifiziert aus [34].

In Verbindung mit der Stereospezifität der individuellen CYPs (siehe Abschnitt 4.3.3) ergibt sich aus dem individuell unterschiedlichen Wirken der EHs ein hohes Maß an Komplexität in Bezug auf Faktoren, die das endogene Profil regio- und stereoisomerer Monoepoxide bestimmen. Ein kürzlich vorgeschlagenes Erklärungsmuster ist die Rolle der mEH als Hydrolase mit primärem Zugriff auf CYP-Metaboliten am ER, während die sEH eher sekundär Zugriff auf Monoepoxide erhält, nachdem diese in das Cytosol freigesetzt wurden [34], siehe Abbildung 4-7. Demnach ist zu erwarten, dass mEH insbesondere unter basalen Bedingungen einen erheblichen Anteil an der enzymatischen Hydrolyse von Monoepoxiden hat. Steigt die Verfügbarkeit freier PUFAs infolge einer PLA<sub>2</sub>-Aktivierung durch physiologische oder pathophysiologische Reize an, bilden CYPs größere Mengen Monoepoxide, die von der vergleichsweise schwach aktiven mEH nicht mehr bewältigt und so möglicherweise für die sEH zugänglich werden. Der tatsächliche Einfluss von mEH und sEH dürfte ferner auch abhängig vom zellspezifischen Expressionslevel dieser Hydrolasen sein [34].

Eine grundsätzliche Frage bleibt, welche Mechanismen der Möglichkeit zugrunde liegen, dass freie Monoepoxide dem Zugriff durch Hydrolasen teilweise auch entgehen können und so ihre biologische Aktivität entfalten und als endogene Vorkommen in Geweben und Plasma in relevanter Menge gemessen werden können. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit beschreibt, dass die Konzentrationen der sEH zwischen 3 (Lunge) und 400 nM (Leber) liegen, während EETs im niedrig nanomolaren Bereich liegen [220]. Das eindeutig nachweisbare Vorliegen freier EETs auch unter basalen Bedingungen, muss demnach mit vor sEH schützenden Mechanismen zusammenhängen, die gegenwärtig nicht bekannt sind. Ein Faktor, der in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte, ist die tatsächliche Enzymaktivität der sEH *in vivo*, die im Zusammenwirken der zahlreichen unterschiedlichen Substrate anders ausgeprägt sein dürfte als *in vitro* beobachtet. Bereits Racemate können andere sEH-Aktivitäten ergeben als einzelne Enantiomere desselben Metaboliten. So wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass murine sEH keine Stereospezifität in Bezug auf 11,12-EET zeigt (vgl. Abbildung 3-26), was scheinbar im Widerspruch zur Literatur steht [89]. Abbildung 4-8 veranschaulicht jedoch, dass sich die früher beschriebene Präferenz für 11(*S*),12(*R*)-EET bestätigt, wenn die Enantiomere wie dort angegeben, einzeln inkubiert werden. Die Aufhebung der Stereospezifität durch die Gegenwart von 11(*R*),12(*S*)-EET überrascht, stimmt jedoch mit dem niedrigeren  $K_m$  des (*R,S*)-Enantiomers überein (bei ebenfalls niedrigerer  $V_{max}$ ) [128]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die sEH den Vereinfachungen der Michaelis-Menten-Kinetik nicht genügt. Als Homo-Dimer wären für dieses Enzym kooperative Effekte in Betracht zu ziehen, eine Korrelationsanalyse ergab sogar direkte Hinweise darauf [36]. Für 14,15-EET hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich stereospezifische Präferenzen der sEH bezogen auf einzelne Enantiomere nicht wesentlich verändern, wenn die Inkubation in Gegenwart von Racemat, 17,18-EEQ und 19,20-EDP erfolgt (Abbildung 3-24). In Anbetracht der Vielzahl potentieller Substrate der sEH allein bezogen auf CYP-Monoepoxide [36] und deren hochkomplexen gegenseitigen Beeinflussung wird der Wert der Chiralphasenanalytik biologischer Proben deutlich, um das



#### Abbildung 4-8 Modulation der Stereospezifität und Aktivität der sEH durch 11,12-EET

Dargestellt sind voneinander unabhängige 20 min-Inkubationen in Gegenwart von jeweils 10  $\mu$ M 11(R),12(S)-EET, 11(S),12(R)-EET oder 10  $\mu$ M Racemat bei 7  $\mu$ g/ml cytosolischer Überstände von Mauslebern. Die Proben wurden extrahiert und mittels der chiralen LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte dargestellt ( $n=3-4$ )  $\pm$  SD.

tatsächliche *in vivo*-Resultat erfassen zu können. Das endogene Vorliegen relevanter Mengen freier Monoepoxide deutet außerdem darauf hin, dass möglicherweise infolge wechselseitiger Inhibition der sEH-Aktivität durch die verschiedenen Substrate, ein gewisser zellulärer Schutzmechanismus gegen Degradation freier Monoepoxide besteht (Abbildung 4-7).

Ein weiterer möglicher Faktor sind Fettsäure-Bindeproteine (FABPs), die auch in der Leber stark exprimiert werden. Diese binden auch EETs und schützen diese *in vitro* vor sEH-abhängiger Hydrolyse [221, 222]. Unter Berücksichtigung der Rolle der FABPs bei dem intrazellulären Transport und der Freisetzung von PUFAs [223, 224] erscheint es, wie Abbildung 4-7 veranschaulicht naheliegend, dass FABPs in ähnlicher Weise auch die Kompartimentierung und Metabolisierung der Monoepoxide regulieren und auf diese Weise vor Hydrolyse im Allgemeinen schützen. Zumindest einige der genannten offenen Fragen können mittels der im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Chiralphasenanalytik potentiell beantwortet werden. Interessant wäre hierzu die Bestimmung des regio- und enantiospezifischen Profils freier und totaler Monoepoxide in verschiedenen Geweben, unter basalen und stimulierten Bedingungen, sowie in der mit Veränderungen der CYP-, mEH-, sEH- und FABP-Expression verbundenen Pathophysiologie. Weiterhin könnte die Effizienz und Spezifität des FABP-regulierten Schutzes der Monoepoxide *in vivo* getestet werden – etwa mittels FABP-Inhibitoren – auch um den potentiellen Einfluss ansteigender Level konkurrierender FABP-Liganden zu untersuchen [222].

Letztlich ist das bessere Verständnis der Bioverfügbarkeit und Stabilisierung freier Monoepoxide *in vivo* eine vielversprechende Grundlage, um deren protektive Wirkung bei ischämischem Organschaden weiter aufzuklären und neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

### **4.3.3 CYPs bilden AA-Eicosanoide stereospezifisch**

Schon in der frühen Phase der CYP-Eicosanoid-Forschung wurde deren Stereospezifität beschrieben, sie katalysieren die Eicosanoidbildung teilweise strikt stereoselektiv, häufig jedoch bilden sie charakteristische Enantiomerenverhältnisse sowohl der Monohydroxide [75] als auch Monoepoxiden [12, 76, 105, 211-213]. Welches Muster an Stereoisomeren CYP-abhängig in Organen wie der Leber gebildet wird, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die Leber erscheint für diese Untersuchungen primär das geeignete Organ, da hier die größte CYP-Aktivität beschriebener Isoformen auftritt und am ehesten Bezüge zur Literatur herstellbar sind. Die sekundäre, NADPH-abhängige Diolbildung der Monoepoxide bei Inkubation von humanen und murinen Lebermikrosomen kann in Gegenwart des mEH-Inhibitors CHO [225, 226] zu mehr als 90% unterdrückt werden (vgl. Abbildung 3-30). Der Effekt auf das Enantiomeren-Muster ist erheblich, etwa eine 4fache Erhöhung von 11(*R*),12(*S*)-EET in murinen- und 5fache Erhöhung von 14(*S*),15(*R*)-EET in humanen Lebermikrosomen (vgl. Abbildung 3-31). Die sEH-Aktivität wird durch Verwendung von Mikrosomen aus Knockout-Tieren oder durch TPPU [227] inhibiert. Die Konzentration der Inhibitoren ist so gewählt, dass einerseits die CYP-Aktivität nicht wesentlich beeinträchtigt, die Diolbildung aber zu wenigstens 90% unterdrückt bleibt. Somit geben die Ergebnisse erstmals ein authentisches Bild der endogenen Stereoselektivität hepatischer CYPs wieder. Die CYP-Aktivität ergibt in humanen Lebermikrosomen einen starken, 8fachen- und in murinen Lebermikrosomen einen 2,5fachen Überschuss der (*R,S*)-Konfiguration von 14,15-EET. Diese wird von den meisten humanen CYPs mit Ausnahme von 2D6 im Überschuss gebildet [211, 212, 214] und findet sich auch endogen in hepatischen Mausleber-Epithelzellen sowie in Lebergewebe der Ratte und des Menschen in abgeschwächter Form (~2,5facher Überschuss) wieder [92, 211, 228]. Die Abschwächung lässt sich mit der in Mikrosomen unterdrückten sEH erklären, für die 14,15 EET und insbesondere dessen (*R,S*)-Konfiguration ein bevorzugtes Substrat ist (vgl. Abbildung 3-27), wie auch in Mauslebern des sEH-Knockouts deutlich wurde (vgl. Abbildung 3-32). Über die Stereoselektivität muriner CYP-Epoxygenasen [102] ist nur wenig bekannt. Bezogen auf 11,12-EET findet sich der in Lebermikrosomen ohne mEH-Inhibition beobachtete Überschuss von 11(*S*),12(*R*)-EET in hepatischen Mausleber-Epithelzellen wieder und wird durch Induktion von CYP 1A1 und 1B1 deutlich verstärkt [211], entsprechende Befunde ergeben sich auch in der Rattenleber [92]. Monoepoxygenasen wie 2C8, 2C9, 2C19 und 2D6 bewirken eine oft gegensätzliche Stereoselektivität [211, 212], die sich auch in Gegenwart von CHO im weniger aussagekräftigen Bild der Mikrosomen zeigt – die Regulationsechanismen der 11,12-EET-Stereoisomere erscheinen somit besonders komplex, auch wenn sie aufgrund der hochspezifischen Wirkung des (*R*),(*S*)-Enantiomers auf Calcium-abhängige Kalium-Kanäle [81] und des (*S*),(*R*)-Enantiomers auf K<sub>ATP</sub>-Kanäle im Herzen [82] von besonderem Interesse sind. Chirale Analysen biologischer Proben aus pathophysiologischen Bedingungen, sowie



eine gewebspezifische Analyse etwa der Tubuli oder von Endothel auf die 11,12-EET-Enantiomere wären vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten der Chiralphasenanalytik. Für 8,9-EET ergibt sich in Gegenwart von CHO ein mäßiger Überschuss des (*S,R*)-Enantiomers in humanen Lebermikrosomen, der zur Selektivität von 2C10 und 2J2 passt, während 2C19 und 2D6 selektiv für das (*R,S*)-Enantiomer sind [211]. Ohne mEH-Inhibition verstärkt sich der Überschuss des (*S,R*)-Enantiomers in den Mikrosomen, dieser ist auch ausgeprägt in hepatischen Mausleber-Epithelzellen [211] und in der Leber der Ratte und des Menschen vorzufinden [92, 228]. In humanen Lebermikrosomen ist zudem ein 4facher Überschuss von 19(*R*)-HETE vorliegend. Dies überrascht, da zwar ebenfalls ein enantiomerer Überschuss für das in der humanen Leber dominierende [229] CYP2E1 bei der 19-HETE-Bildung beschrieben ist, jedoch mit Präferenz für die (*S*)-Konfiguration [75]. Weitere Versuche mit CYP1A1 und 3A4 sollten zur Aufklärung des Befundes in Betracht gezogen werden, weiterhin erscheint eine chirale Analyse mit EPA und DHA inkubierter Mikrosomen vielversprechend, um die stereospezifische Bildung, Wirkung und Hydrolyse insbesondere von 17,18-EEQ und 19,20-EDP besser einzuordnen (vgl. Abbildung 3-28 und 3-29). Insgesamt ergeben die Befunde auf mikrosomaler Ebene mittels der etablierten Chiralphasenanalytik einen wertvollen Einblick in die endogene Enantiomeren-Zusammensetzung bestimmter Organe und Gewebe, wobei die Regulation bioverfügbarer Enantiomere durch Inhibitoren und andere Modulatoren ausführlich untersucht und die individuelle pathophysiologische Rolle der beteiligten Enzyme herausgearbeitet werden kann.

#### **4.3.4 Die Bildung von 18-HEPE durch CYP1A1 und Stimulation humaner Blutproben ist stereoselektiv**

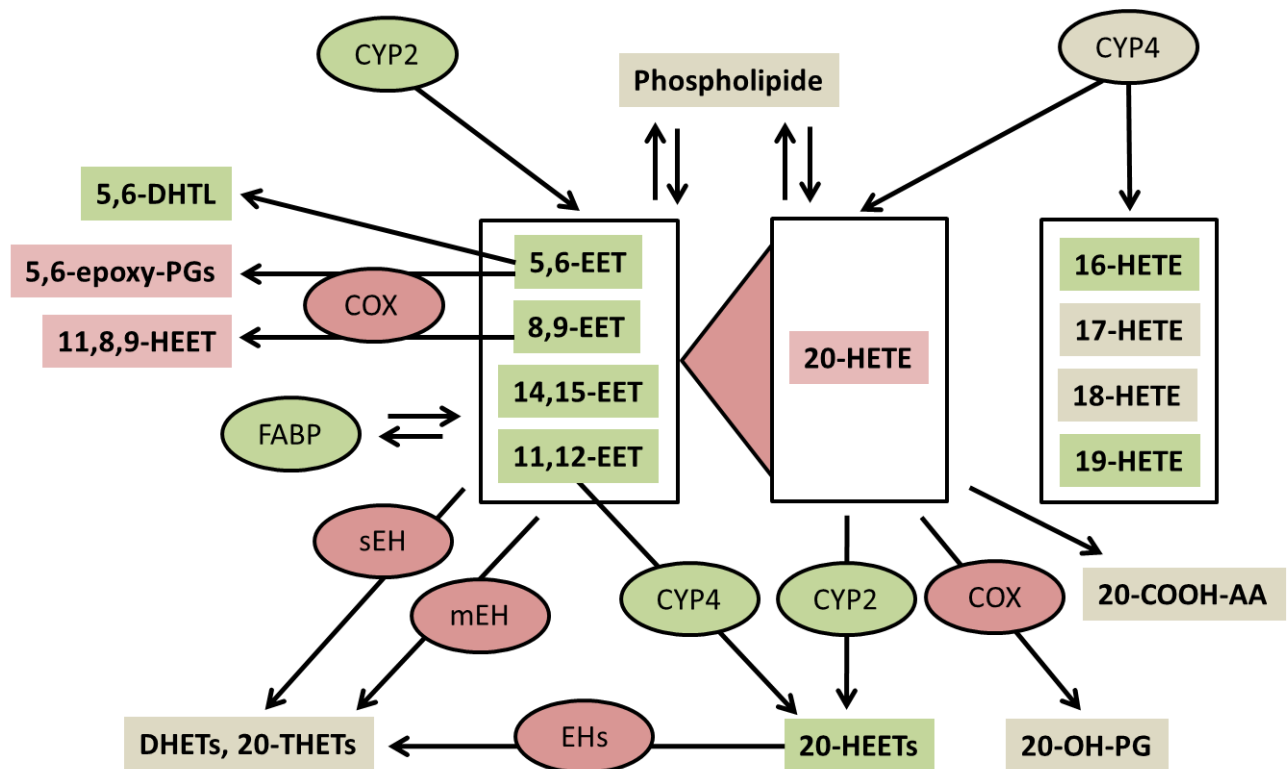
Eine enzymatische Herkunft von 18-HEPE, dem Precursor der E-Resolvine, ist bisher lediglich in Bezug auf acetylierte COX-2 [101, 230] und das bakterielle CYPBM-3 beschrieben [206]. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Anwendung der Chiralphasenanalytik gezeigt werden, dass humanes CYP1A1 in erheblicher Menge und hochgradig stereoselektiv 18-HEPE bildet. Damit wird die mögliche Bedeutung von CYPs in Bezug auf die E-Resolvin-Bildung erkenntlich. Unabhängig davon gibt es Hinweise in der Literatur darauf, dass Resolvin-E1 CYP-abhängig aus LTB<sub>5</sub> gebildet werden kann [231]. E-Resolvine spielen eine erhebliche Rolle bei der Begrenzung und Auflösung von Entzündungsprozessen durch anti-fibrotische und anti-apoptotische Effekte auch bei AKI [232]. Weitere chirale Analysen von 18-HEPE gerade auch im Zusammenhang mit I/R-Organschäden erscheinen daher vielversprechend, um sowohl Herkunft als auch Wirkung dieser Metaboliten-Kaskade weiter aufzuklären. Zwar ist in der Literatur die Identifizierung der 18-HEPE-Enantiomere anhand chemischer Synthesen bereits wiederholt vorgenommen worden [206, 233], jedoch

veranlassen widersprüchliche Angaben zur Stereospezifität der acetylierten COX-2-abhängigen 18-HEPE-Bildung [230, 231] dazu, die Identitäten der Enantiomere in der vorliegenden Arbeit nicht zu determinieren, dies kann anhand der genannten Elutionsreihenfolge später noch zugeordnet werden.

Die Analyse von humanem Plasma als weiteres Anwendungsbeispiel der etablierten Chiralphasenanalytik ergibt stets als Racemate vorliegende Monohydroxide. Dagegen werden Überschüsse einzelner Enantiomere beobachtet, wenn deren *de novo* – Biosynthese im Vollblut durch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor stimuliert wird (vgl. Abbildung 3-36). 18-HEPE erhöht sich bei Stimulation in stereospezifischer Weise. Weiterhin folgt ein spezifischer Anstieg der (*S*)-Enantiomere jener HETEs, HEPEs und HDHAs, die bekannter maßen von 5-, 12- und 15-LOX in Blutzellen gebildet werden [234-236]. Es gibt jedoch bisher keine Hinweise auf eine LOX-abhängige 18-HEPE-Bildung. Keine Veränderungen treten bei 9-HETE auf – ein racemischer Metabolit, der durch freie radiakliche Oxidation gebildet wird [237]. Die Befunde stehen im Einklang mit einer kürzlich publizierten Studie, in der die Stimulation mit Lipopolysaccharid und Zymosan erfolgt [99]. Abweichend davon ergibt  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor-Stimulation jedoch auch eine stimulierte Bildung von 11(*R*)-HETE, das als Produkt von COX-Enzymen zugeordnet werden kann [238]. Da CYP-Eicosanoide nicht stimuliert werden, legt der Befund eine COX-abhängige 18-HEPE-Bildung in humanem Plasma nahe.

## **4.4 Ausblick**

CYP-Eicosanoide werden im I/R-Modell des akuten Nierenschadens in der initialen Phase freigesetzt, wobei protektiv wirkende EETs rapide durch Epoxid-Hydrolasen inaktiviert und teilweise durch COX zu schädigend wirkenden Metaboliten umgesetzt werden. EET-Analoga können den Verlust der EETs kompensieren und in der initialen Phase des I/R-Schadens möglicherweise als geeignete therapeutische Intervention zum Schutz vor ischämischer AKI dienen. Der Sekundärmetabolismus der CYP-Eicosanoide ist komplex und wie deren Bildung und biologische Wirkung mit Ausnahme von 20-HETE stereospezifisch. Die etablierte Chiralphasen-Analytik wurde bereits genutzt, um die stereoselektive, CYP-abhängige Bildung, als auch den Abbau der Eicosanoide durch sEH und mEH genauer aufzuklären. Dadurch konnte der Beitrag der jeweiligen Stoffwechselwege zum endogenen Eicosanoidprofil näher bestimmt werden. Das Schema in Abbildung 4-9 gibt die Vielzahl noch zu untersuchender stereospezifischer Regulationsprozesse sowie die Wirkung der Eicosanoide wider, über die bisher oft nur eine Aussage in Bezug auf nicht näher bestimmte Gemische korrespondierender Enantiomere gemacht werden kann. Dazu ist die etablierte Chiralphasenanalytik umfassend geeignet. Kürzlich verfügbar gewordene enantiomerenreine Standardsubstanzen für weitere subterminale Monohydroxide wie 16 und 17-HETE und andere Eicosanoide können als Erweiterung problemlos in die Analytik aufgenommen werden. Weiterhin erlaubte die in dieser Arbeit durchgeführte chirale



**Abbildung 4-9 Bildung und postulierte Rolle von primär- und Sekundärprodukten des CYP-abhängigen AA-Metabolismus bei der Auslösung des ischämischen akuten Nierenversagens**

In der initialen Phase des I/R-Schadens tritt ein Ungleichgewicht freier 20-HETE und EETs ein, das im Kontext des Sekundärmetabolismus mit seiner protektiven (grün) oder schädigenden (rot) Wirkung abgebildet ist. Bestandteile mit mehrdeutiger oder unerforschter Wirkung sind grau markiert. Mit Ausnahme von 20-HETE, unterliegt die Wirkung sämtlicher dargestellter Metaboliten und Pathways einer oft nur unzureichend aufgeklärten Stereospezifität, die mittels der etablierten Chiralphasenanalytik potentiell aufgeklärt werden kann. Für aus weiteren PUFAs wie LA, EPA und DHA abgeleitete Eicosanoide ist anzunehmen, dass sich vergleichbare Schemata wie hier dargestellt ergeben.

Analyse biologischer Proben die Bestimmung des tatsächlich wirksamen Anteils endogen auftretender Eicosanoide, sofern die enantiospezifische Wirkung bereits bekannt war. Daraus ergibt sich für weitere Anwendungen die Perspektive, durch Erkennen chiraler Musterverschiebungen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Auftreten ischämischer Organschäden und kardiovaskulärer Erkrankungen mit dem endogenen Profil wirksamer Eicosanoide herzustellen.

# Literaturverzeichnis

1. Simopoulos, A.P., *Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet*. World Rev Nutr Diet, 2011. 102: p. 10-21.
2. Schunck, W.H., et al., *Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases*. Pharmacol Ther, 2018. 183: p. 177-204.
3. Dyerberg, J., et al., *Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?* Lancet, 1978. 2(8081): p. 117-9.
4. Bhatt, D.L., et al., *Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia*. N Engl J Med, 2019. 380(1): p. 11-22.
5. Konkel, A. and W.H. Schunck, *Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1814(1): p. 210-22.
6. Jump, D.B., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids as a treatment strategy for nonalcoholic fatty liver disease*. Pharmacol Ther, 2018. 181: p. 108-125.
7. Gabbs, M., et al., *Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs*. Adv Nutr, 2015. 6(5): p. 513-40.
8. Bonventre, J.V., et al., *Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2*. Nature, 1997. 390(6660): p. 622-5.
9. Rapoport, S.I., *Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2008. 79(3-5): p. 153-6.
10. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. 294(5548): p. 1871-5.
11. Kuhn, H., S. Banthiya, and K. van Leyen, *Mammalian lipoxygenases and their biological relevance*. Biochim Biophys Acta, 2015. 1851(4): p. 308-30.
12. Capdevila, J.H. and J.R. Falck, *Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: p. 325-44.
13. Spector, A.A., et al., *Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function*. Prog Lipid Res, 2004. 43(1): p. 55-90.
14. Hardwick, J.P., et al., *Eicosanoids in metabolic syndrome*. Adv Pharmacol, 2013. 66: p. 157-266.
15. Campbell, W.B. and J.R. Falck, *Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors*. Hypertension, 2007. 49(3): p. 590-6.
16. Chiang, N. and C.N. Serhan, *Cell-cell interaction in the transcellular biosynthesis of novel omega-3-derived lipid mediators*. Methods Mol Biol, 2006. 341: p. 227-50.
17. Vane, J.R., *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs*. Nat New Biol, 1971. 231(25): p. 232-5.
18. Schunck, W.H. and C. Schmidt, *Cytochrome P450-Dependent Eicosanoids*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ed. M. Bader. Vol. In: Cardiovascular Hormone Systems. 2008. 333-372.
19. Im, S.C. and L. Waskell, *The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5)*. Arch Biochem Biophys, 2011. 507(1): p. 144-53.
20. Capdevila, J., et al., *Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(9): p. 5362-6.
21. Oliw, E.H., et al., *Arachidonic acid metabolism in rabbit renal cortex. Formation of two novel dihydroxyeicosatrienoic acids*. J Biol Chem, 1981. 256(19): p. 9924-31.

22. Bylund, J., et al., *Cytochromes P450 with bisallylic hydroxylation activity on arachidonic and linoleic acids studied with human recombinant enzymes and with human and rat liver microsomes*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. 284(1): p. 51-60.
23. Muller, D.N., et al., *A peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator induces renal CYP2C23 activity and protects from angiotensin II-induced renal injury*. Am J Pathol, 2004. 164(2): p. 521-32.
24. Blum, M., *Bildung von Hydroxyepoxymetaboliten der Arachidonsäure durch heterolog exprimierte Cytochrom P450-Isoformen*, F. Schauer, Editor 2011, Ernst-Moritz-Arndt-Universität: Greifswald.
25. Homma, T., et al., *Cyclooxygenase-derived metabolites of 8,9-epoxyeicosatrienoic acid are potent mitogens for cultured rat glomerular mesangial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. 191(1): p. 282-8.
26. Escalante, B., et al., *Vasoactivity of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid is dependent on metabolism by cyclooxygenase*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. 248(1): p. 229-32.
27. Cheng, M.K., J.C. McGiff, and M.A. Carroll, *Renal arterial 20-hydroxyeicosatetraenoic acid levels: regulation by cyclooxygenase*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. 284(3): p. F474-9.
28. Kubota, T., et al., *Eicosapentaenoic acid is converted via omega-3 epoxxygenation to the anti-inflammatory metabolite 12-hydroxy-17,18-epoxyeicosatetraenoic acid*. FASEB J, 2014. 28(2): p. 586-93.
29. Capdevila, J.H., J.R. Falck, and R.C. Harris, *Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase*. J Lipid Res, 2000. 41(2): p. 163-81.
30. Imig, J.D. and B.D. Hammock, *Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2009. 8(10): p. 794-805.
31. Fischer, R., et al., *METABOLICALLY ROBUST ANALOGS OF CYP-EICOSANOIDS FOR THE TREATMENT OF CARDIAC DISEASE* WO 2017/013265, 2017.
32. Carroll, M.A., et al., *Cytochrome P450-derived renal HETEs: storage and release*. Kidney Int, 1997. 51(6): p. 1696-702.
33. Harris, T.R. and B.D. Hammock, *Soluble epoxide hydrolase: gene structure, expression and deletion*. Gene, 2013. 526(2): p. 61-74.
34. Edin, M.L., et al., *Epoxide hydrolase 1 (EPHX1) hydrolyzes epoxyeicosanoids and impairs cardiac recovery after ischemia*. J Biol Chem, 2018. 293(9): p. 3281-3292.
35. Hoopes, S.L., et al., *Generation and characterization of epoxide hydrolase 3 (EPHX3)-deficient mice*. PLoS One, 2017. 12(4): p. e0175348.
36. Morisseau, C., et al., *Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids*. J Lipid Res, 2010. 51(12): p. 3481-90.
37. Gomez, G.A., et al., *Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis*. Biochemistry, 2004. 43(16): p. 4716-23.
38. Fan, F. and R.J. Roman, *GPR75 Identified as the First 20-HETE Receptor: A Chemokine Receptor Adopted by a New Family*. Circ Res, 2017. 120(11): p. 1696-1698.
39. Spector, A.A. and H.Y. Kim, *Cytochrome P450 epoxxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2015. 1851(4): p. 356-65.
40. Rocic, P. and M.L. Schwartzman, *20-HETE in the regulation of vascular and cardiac function*. Pharmacol Ther, 2018. 192: p. 74-87.
41. Hoff, U., et al., *Inhibition of 20-HETE synthesis and action protects the kidney from ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2011. 79(1): p. 57-65.
42. Shoieb, S.M., A.A. El-Sherbeni, and A.O.S. El-Kadi, *Subterminal hydroxyeicosatetraenoic acids: Crucial lipid mediators in normal physiology and disease states*. Chem Biol Interact, 2018. 299: p. 140-150.
43. Hwang, S.H., et al., *Chemical synthesis and biological evaluation of omega-hydroxy polyunsaturated fatty acids*. Bioorg Med Chem Lett, 2017. 27(3): p. 620-625.

44. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. Nat Med, 2011. 17(11): p. 1391-401.
45. Sutton, T.A., C.J. Fisher, and B.A. Molitoris, *Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2002. 62(5): p. 1539-49.
46. Adin, C.A., B.P. Croker, and A. Agarwal, *Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. 288(4): p. F778-84.
47. Braun, D., et al., *Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal Arteries Impairs Vasorelaxation via Modulation of Endothelium-Independent sGC/cGMP/PKG Signaling*. Front Physiol, 2018. 9: p. 480.
48. Liu, L.J., J.J. Yu, and X.L. Xu, *Kappa-opioid receptor agonist U50448H protects against renal ischemia-reperfusion injury in rats via activating the PI3K/Akt signaling pathway*. Acta Pharmacol Sin, 2018. 39(1): p. 97-106.
49. Roman, R.J., *P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function*. Physiol Rev, 2002. 82(1): p. 131-85.
50. Carroll, M.A., *Role of the adenosine(2A) receptor-epoxyeicosatrienoic acid pathway in the development of salt-sensitive hypertension*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2012. 98(3-4): p. 39-47.
51. Roman, R.J., et al., *20-HETE in acute kidney injury*. Kidney Int, 2011. 79(1): p. 10-3.
52. Kusch, A., et al., *Novel signalling mechanisms and targets in renal ischaemia and reperfusion injury*. Acta Physiol (Oxf), 2013. 208(1): p. 25-40.
53. Miyata, N., et al., *Beneficial effects of a new 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis inhibitor, TS-011 [N-(3-chloro-4-morpholin-4-yl) phenyl-N'-hydroxyimido formamide], on hemorrhagic and ischemic stroke*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. 314(1): p. 77-85.
54. Wei, Y., et al., *The cardioprotection of dihydrotanshinone I against myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of arachidonic acid omega-hydroxylase*. Can J Physiol Pharmacol, 2016. 94(12): p. 1267-1275.
55. Dhanasekaran, A., et al., *Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxyeicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 294(2): p. H724-35.
56. Yang, B., et al., *Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells*. Mol Pharmacol, 2001. 60(2): p. 310-20.
57. Yu, G.G., et al., *Cytochrome P450 2J3/epoxyeicosatrienoic acids mediate the cardioprotection induced by ischaemic post-conditioning, but not preconditioning, in the rat*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. 38(1): p. 63-70.
58. Gross, G.J., et al., *Effects of the selective EET antagonist, 14,15-EEZE, on cardioprotection produced by exogenous or endogenous EETs in the canine heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 294(6): p. H2838-44.
59. Kaergel, E., et al., *P450-dependent arachidonic acid metabolism and angiotensin II-induced renal damage*. Hypertension, 2002. 40(3): p. 273-9.
60. Lee, C.R., et al., *Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenases lowers blood pressure and attenuates hypertension-induced renal injury in mice*. FASEB J, 2010. 24(10): p. 3770-81.
61. Imig, J.D., *Prospective for cytochrome P450 epoxygenase cardiovascular and renal therapeutics*. Pharmacol Ther, 2018.
62. Seubert, J.M., et al., *Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function*. Circ Res, 2006. 99(4): p. 442-50.
63. Samokhvalov, V., et al., *SIRT Is Required for EDP-Mediated Protective Responses toward Hypoxia-Reoxygenation Injury in Cardiac Cells*. Front Pharmacol, 2016. 7: p. 124.
64. Wu, S., et al., *Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes*. J Biol Chem, 1997. 272(19): p. 12551-9.

65. Batchu, S.N., et al., *Epoxyeicosatrienoic acid prevents postischemic electrocardiogram abnormalities in an isolated heart model*. J Mol Cell Cardiol, 2009. 46(1): p. 67-74.
66. Seubert, J.M., et al., *Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. 82(1-4): p. 50-9.
67. Edin, M.L., et al., *Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenase CYP2C8 increases susceptibility to ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart*. Faseb Journal, 2011. 25(10): p. 3436-3447.
68. Gross, G.J., et al., *Mechanisms by which epoxyeicosatrienoic acids (EETs) elicit cardioprotection in rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2007. 42(3): p. 687-91.
69. Nithipatikom, K., et al., *Inhibition of cytochrome P450 omega-hydroxylase: a novel endogenous cardioprotective pathway*. Circ Res, 2004. 95(8): p. e65-71.
70. Koerner, I.P., et al., *Soluble epoxide hydrolase: regulation by estrogen and role in the inflammatory response to cerebral ischemia*. Front Biosci, 2008. 13: p. 2833-41.
71. Nilakantan, V., et al., *20-HETE-mediated cytotoxicity and apoptosis in ischemic kidney epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. 294(3): p. F562-70.
72. Deng, B.Q., et al., *Epoxide metabolites of arachidonate and docosahexaenoate function conversely in acute kidney injury involved in GSK3beta signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. 114(47): p. 12608-12613.
73. Regner, K.R., et al., *Protective effect of 20-HETE analogues in experimental renal ischemia reperfusion injury*. Kidney Int, 2009. 75(5): p. 511-7.
74. Cahn, R.S., C. Ingold, and V. Prelog, *Specification of Molecular Chirality*. Angewandte Chemie-International Edition, 1966. 5(4): p. 385-&.
75. Laethem, R.M., et al., *Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1*. J Biol Chem, 1993. 268(17): p. 12912-8.
76. Barbosa-Sicard, E., et al., *Eicosapentaenoic acid metabolism by cytochrome P450 enzymes of the CYP2C subfamily*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 329(4): p. 1275-81.
77. Van Os, C.P., et al., *Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1. Kinetics and regio-stereo specificities of the reaction steps*. Biochim Biophys Acta, 1981. 663(1): p. 177-93.
78. Lecomte, M., et al., *Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin*. J Biol Chem, 1994. 269(18): p. 13207-15.
79. Chiang, N., et al., *Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(42): p. 15178-83.
80. Arnold, C., et al., *Arachidonic Acid-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Are Targets of Omega-3 Fatty Acids*. J Biol Chem, 2010. 285(43): p. 32720-31733.
81. Ding, Y., et al., *The biological actions of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid in endothelial cells are specific to the R/S-enantiomer and require the G(s) protein*. J Pharmacol Exp Ther, 2014. 350(1): p. 14-21.
82. Lu, T., M. VanRollins, and H.C. Lee, *Stereospecific activation of cardiac ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids: a structural determinant study*. Mol Pharmacol, 2002. 62(5): p. 1076-83.
83. Lauterbach, B., et al., *Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators*. Hypertension, 2002. 39(2 Pt 2): p. 609-13.
84. Zou, A.P., et al., *Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K(+)-channel activity*. Am J Physiol, 1996. 270(5 Pt 2): p. F822-32.
85. Cheng, J., et al., *20-hydroxyeicosatetraenoic acid causes endothelial dysfunction via eNOS uncoupling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 294(2): p. H1018-26.
86. Zhang, F., et al., *Decreased levels of cytochrome P450 2E1-derived eicosanoids sensitize renal arteries to constrictor agonists in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2005. 45(1): p. 103-8.

87. Carroll, M.A., et al., *Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides*. *Am J Physiol*, 1996. 271(4 Pt 2): p. R863-9.
88. Karara, A., et al., *Endogenous epoxyeicosatrienoyl-phospholipids. A novel class of cellular glycerolipids containing epoxidized arachidonate moieties*. *J Biol Chem*, 1991. 266(12): p. 7561-9.
89. Zeldin, D.C., et al., *Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase*. *J Biol Chem*, 1993. 268(9): p. 6402-7.
90. Kuhn, H., et al., *Analysis of the stereochemistry of lipoxygenase-derived hydroxypolyenoic fatty acids by means of chiral phase high-pressure liquid chromatography*. *Anal Biochem*, 1987. 160(1): p. 24-34.
91. Hammonds, T.D., et al., *Resolution of epoxyeicosatrienoate enantiomers by chiral phase chromatography*. *Anal Biochem*, 1989. 182(2): p. 300-3.
92. Karara, A., et al., *Endogenous epoxyeicosatrienoic acids. Cytochrome P-450 controlled stereoselectivity of the hepatic arachidonic acid epoxigenase*. *J Biol Chem*, 1989. 264(33): p. 19822-7.
93. Karara, A., et al., *Arachidonic acid epoxigenase. Stereochemical analysis of the endogenous epoxyeicosatrienoic acids of human kidney cortex*. *FEBS Lett*, 1990. 268(1): p. 227-30.
94. Zeldin, D.C., et al., *The rabbit pulmonary cytochrome P450 arachidonic acid metabolic pathway: characterization and significance*. *J Clin Invest*, 1995. 95(5): p. 2150-60.
95. Karara, A., et al., *Arachidonic acid epoxigenase: structural characterization and quantification of epoxyeicosatrienoates in plasma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 182(3): p. 1320-5.
96. Willenberg, I., A.I. Ostermann, and N.H. Schebb, *Targeted metabolomics of the arachidonic acid cascade: current state and challenges of LC-MS analysis of oxylipins*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. 407(10): p. 2675-83.
97. Astarita, G., et al., *Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1851(4): p. 456-68.
98. Mesaros, C. and I.A. Blair, *Targeted chiral analysis of bioactive arachidonic Acid metabolites using liquid-chromatography-mass spectrometry*. *Metabolites*, 2012. 2(2): p. 337-65.
99. Mazaleuskaya, L.L., et al., *Analysis of HETEs in human whole blood by chiral UHPLC-ECAPCI/HRMS*. *J Lipid Res*, 2018. 59(3): p. 564-575.
100. Kiss, L., et al., *Direct and simultaneous profiling of epoxyeicosatrienoic acid enantiomers by capillary tandem column chiral-phase liquid chromatography with dual online photodiode array and tandem mass spectrometric detection*. *Anal Bioanal Chem*, 2008. 392(4): p. 717-26.
101. Oh, S.F., et al., *Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation*. *J Clin Invest*, 2011. 121(2): p. 569-81.
102. Isobe, Y., et al., *Comprehensive analysis of the mouse cytochrome P450 family responsible for omega-3 epoxidation of eicosapentaenoic acid*. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 7954.
103. Homann, J., et al., *Chiral chromatography-tandem mass spectrometry applied to the determination of pro-resolving lipid mediators*. *Journal of Chromatography A*, 2014. 1360: p. 150-163.
104. Toewe, A., et al., *Simultaneous determination of PUFA-derived pro-resolving metabolites and pathway markers using chiral chromatography and tandem mass spectrometry*. *Anal Chim Acta*, 2018. 1031: p. 185-194.
105. Wei, S., et al., *Chiral resolution of the epoxyeicosatrienoic acids, arachidonic acid epoxigenase metabolites*. *Anal Biochem*, 2006. 352(1): p. 129-34.
106. Tsui, H.W., et al., *Mechanistic Studies of Chiral Discrimination in Polysaccharide Phases*. *Adv Chromatogr*, 2012. 50: p. 47-91.
107. Scriba, G.K.E., *Chiral recognition in separation science - an update*. *J Chromatogr A*, 2016. 1467: p. 56-78.
108. Gallinella, B., et al., *Direct separation of the enantiomers of oxaliplatin on a cellulose-based chiral stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography mode*. *J Chromatogr A*, 2014. 1339: p. 210-3.
109. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75.



110. Goloshchapova, K., et al., *Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium Myxococcus fulvus exhibiting complex social living patterns*. Microbiologyopen, 2018; p. e775.
111. Fischer, R., et al., *Dietary omega-3 fatty acids modulate the eicosanoid profile in man primarily via the CYP-epoxygenase pathway*. J Lipid Res, 2014. 55(6): p. 1150-1164.
112. Hoff, U., et al., *A SYNTHETIC EPOXYEICOSATRIENOIC ACID ANALOG PREVENTS THE INITIATION OF ISCHEMIC ACUTE KIDNEY INJURY*. Acta Physiol (Oxf), 2019; p. in progress.
113. Luria, A., et al., *Compensatory mechanism for homeostatic blood pressure regulation in Ephx2 gene-disrupted mice*. J Biol Chem, 2007. 282(5): p. 2891-8.
114. Monti, J., et al., *Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease*. Nat Genet, 2008. 40(5): p. 529-37.
115. Taft, D.R., *The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development*. Curr Drug Discov Technol, 2004. 1(1): p. 97-111.
116. Bekersky, I., *Use of the isolated perfused kidney as a tool in drug disposition studies*. Drug Metab Rev, 1983. 14(5): p. 931-60.
117. Zhang, J.Y. and I.A. Blair, *Direct resolution of epoxyeicosatrienoic acid enantiomers by chiral-phase high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994. 657(1): p. 23-9.
118. Schwarz, D., et al., *Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid*. Biochem Pharmacol, 2004. 67(8): p. 1445-57.
119. Falck, J.R., et al., *14,15-Epoxyeicosa-5,8,11-trienoic acid (14,15-EET) surrogates containing epoxide bioisosteres: influence upon vascular relaxation and soluble epoxide hydrolase inhibition*. J Med Chem, 2009. 52(16): p. 5069-75.
120. Tanaka, R., et al., *Sex differences in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury depends on the degradation of noradrenaline by monoamine oxidase*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017. 44(3): p. 371-377.
121. Hutchens, M.P., et al., *Renal ischemia: does sex matter?* Anesth Analg, 2008. 107(1): p. 239-49.
122. Haase, M., et al., *Prophylactic perioperative sodium bicarbonate to prevent acute kidney injury following open heart surgery: a multicenter double-blinded randomized controlled trial*. PLoS Med, 2013. 10(4): p. e1001426.
123. Zhu, Y., et al., *Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Soluble Epoxide Hydrolase-Deficient Mice*. PLoS One, 2016. 11(1): p. e0145645.
124. Blum, M., et al., *Chiral lipidomics of monoepoxy and monohydroxy metabolites derived from long-chain polyunsaturated fatty acids*. J Lipid Res, 2019. 60(1): p. 135-148.
125. Food\_and\_Drug\_Administration. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 2018; Available from: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
126. Ding, J., et al., *Enantioseparation of chiral mandelic acid derivatives by supercritical fluid chromatography*. Chirality, 2018. 30(12): p. 1245-1256.
127. Falck, J.R., et al., *17(R),18(S)-Epoxyeicosatetraenoic Acid, a Potent Eicosapentaenoic Acid (EPA) Derived Regulator of Cardiomyocyte Contraction: Structure-Activity Relationships and Stable Analogues*. J Med Chem, 2011. 54(12): p. 4109-4118.
128. Zeldin, D.C., et al., *Metabolism of epoxyeicosatrienoic acids by cytosolic epoxide hydrolase: substrate structural determinants of asymmetric catalysis*. Arch Biochem Biophys, 1995. 316(1): p. 443-51.
129. Nakamura, H., et al., *Subcellular characteristics of phospholipase A2 activity in the rat kidney. Enhanced cytosolic, mitochondrial, and microsomal phospholipase A2 enzymatic activity after renal ischemia and reperfusion*. J Clin Invest, 1991. 87(5): p. 1810-8.
130. Tabuchi, S., et al., *Mice deficient in cytosolic phospholipase A2 are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury*. Acta Neurochir Suppl, 2003. 86: p. 169-72.

131. Saito, Y., et al., *Disruption of group IVA cytosolic phospholipase A(2) attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury partly through inhibition of TNF-alpha-mediated pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. 302(10): p. H2018-30.
132. Al Asmari, A.K., et al., *Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats*. BMC Nephrol, 2017. 18(1): p. 41.
133. Jiang, H., et al., *Vitamin C activation of the biosynthesis of epoxyeicosatrienoic acids*. Adv Biosci Biotechnol, 2012. 3(3): p. 204-218.
134. Campbell, W.B., et al., *Orally Active Epoxyeicosatrienoic Acid Analogs*. J Cardiovasc Pharmacol, 2017. 70(4): p. 211-224.
135. Khan, A.H., et al., *Epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates angiotensin II hypertension and kidney injury*. Front Pharmacol, 2014. 5: p. 216.
136. Liu, W.J., et al., *CYP2C8-derived epoxyeicosatrienoic acids decrease oxidative stress-induced endothelial apoptosis in development of atherosclerosis: Role of Nrf2 activation*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2015. 35(5): p. 640-645.
137. Gross, G.J., et al., *Roles of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in epoxyeicosatrienoic acid (EET)-induced cardioprotection against infarction in intact rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2013. 59: p. 20-9.
138. Tunctan, B., et al., *Prostaglandins inhibit cytochrome P450 4A activity and contribute to endotoxin-induced hypotension in rats via nitric oxide production*. Arch Pharm Res, 2008. 31(7): p. 856-65.
139. Dordea, A.C., et al., *Androgen-sensitive hypertension associated with soluble guanylate cyclase-alpha1 deficiency is mediated by 20-HETE*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. 310(11): p. H1790-800.
140. Nithipatikom, K., et al., *Determination of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in coronary venous plasma during ischemia and reperfusion in dogs*. Anal Biochem, 2001. 292(1): p. 115-24.
141. Fan, F. and R.J. Roman, *Effect of Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic Acid in Nephrology*. J Am Soc Nephrol, 2017. 28(10): p. 2845-2855.
142. Dolegowska, B., W. Blogowski, and L. Domanski, *Is it possible to predict the early post-transplant allograft function using 20-HETE measurements? A preliminary report*. Transpl Int, 2009. 22(5): p. 546-53.
143. Katoh, T., et al., *Glomerular stereospecific synthesis and hemodynamic actions of 8,9-epoxyeicosatrienoic acid in rat kidney*. Am J Physiol, 1991. 261(4 Pt 2): p. F578-86.
144. Takahashi, K., et al., *Cytochrome P-450 arachidonate metabolites in rat kidney: characterization and hemodynamic responses*. Am J Physiol, 1990. 258(4 Pt 2): p. F781-9.
145. Zhang, J.Y., et al., *Regiospecific and enantioselective metabolism of 8,9-epoxyeicosatrienoic acid by cyclooxygenase*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 183(1): p. 138-43.
146. Jamieson, K.L., et al., *Cytochrome P450-derived eicosanoids and heart function*. Pharmacol Ther, 2017. 179: p. 47-83.
147. Shuey, M.M., et al., *Association of gain-of-function EPHX2 polymorphism Lys55Arg with acute kidney injury following cardiac surgery*. PLoS One, 2017. 12(5): p. e0175292.
148. Regner, K.R. and R.J. Roman, *Role of medullary blood flow in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012. 21(1): p. 33-8.
149. Imig, J.D., et al., *Actions of epoxygenase metabolites on the preglomerular vasculature*. J Am Soc Nephrol, 1996. 7(11): p. 2364-70.
150. Muthalif, M.M., et al., *20-Hydroxyeicosatetraenoic acid mediates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(21): p. 12701-6.
151. Cheng, J., et al., *20-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid mediates endothelial dysfunction via IkappaB kinase-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. 332(1): p. 57-65.

152. Ishizuka, T., et al., *20-Hydroxyecosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells.* J Pharmacol Exp Ther, 2008. 324(1): p. 103-10.
153. Eid, A.A., et al., *Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases.* Diabetes, 2009. 58(5): p. 1201-11.
154. Ge, Y., et al., *Endogenously produced 20-HETE modulates myogenic and TGF response in microperfused afferent arterioles.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2013. 102-103: p. 42-8.
155. Muroya, Y., et al., *Deficiency in the Formation of 20-Hydroxyecosatetraenoic Acid Enhances Renal Ischemia-Reperfusion Injury.* J Am Soc Nephrol, 2015. 26(10): p. 2460-9.
156. Campbell, W.B. and I. Fleming, *Epoxyecosatrienoic acids and endothelium-dependent responses.* Pflugers Arch, 2010. 459(6): p. 881-95.
157. Node, K., et al., *Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids.* Science, 1999. 285(5431): p. 1276-9.
158. Wray, J.A., et al., *The epoxygenases CYP2J2 activates the nuclear receptor PPARalpha in vitro and in vivo.* PLoS One, 2009. 4(10): p. e7421.
159. Cowart, L.A., et al., *The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyecosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands.* J Biol Chem, 2002. 277(38): p. 35105-12.
160. Bodiga, S., et al., *Protective actions of epoxyecosatrienoic acid: dual targeting of cardiovascular PI3K and KATP channels.* J Mol Cell Cardiol, 2009. 46(6): p. 978-88.
161. Capdevila, J.H. and J.R. Falck, *The arachidonic acid monooxygenase: from biochemical curiosity to physiological/pathophysiological significance.* J Lipid Res, 2018. 59(11): p. 2047-2062.
162. Wei, Y., et al., *Arachidonic acid inhibits epithelial Na channel via cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-dependent metabolic pathways.* J Gen Physiol, 2004. 124(6): p. 719-27.
163. Aufhauser, D.D., Jr., et al., *Improved renal ischemia tolerance in females influences kidney transplantation outcomes.* J Clin Invest, 2016. 126(5): p. 1968-77.
164. Muller, D.N., et al., *Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyecosatetraenoic acid formation.* Biochem J, 2007. 403(1): p. 109-18.
165. Wu, C.C., et al., *Androgen-sensitive hypertension associates with upregulated vascular CYP4A12-20-HETE synthase.* J Am Soc Nephrol, 2013. 24(8): p. 1288-96.
166. Zhang, W., et al., *Role of soluble epoxide hydrolase in the sex-specific vascular response to cerebral ischemia.* J Cereb Blood Flow Metab, 2009. 29(8): p. 1475-81.
167. Huang, A. and D. Sun, *Sexually Dimorphic Regulation of EET Synthesis and Metabolism: Roles of Estrogen.* Front Pharmacol, 2018. 9: p. 1222.
168. Huang, A., et al., *Estrogen elicits cytochrome P450-mediated flow-induced dilation of arterioles in NO deficiency: role of PI3K-Akt phosphorylation in genomic regulation.* Circ Res, 2004. 94(2): p. 245-52.
169. Huang, A. and G. Kaley, *Gender-specific regulation of cardiovascular function: estrogen as key player.* Microcirculation, 2004. 11(1): p. 9-38.
170. Kher, A., et al., *Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia-reperfusion injury.* Cardiovasc Res, 2005. 67(4): p. 594-603.
171. Vafapour, M., et al., *Effect of Gamma-aminobutyric acid on kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion in male and female rats: Gender-related difference.* Adv Biomed Res, 2015. 4: p. 158.
172. Schwartz-Bloom, R.D. and R. Sah, *gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia.* J Neurochem, 2001. 77(2): p. 353-71.
173. Luria, A., et al., *Alteration in plasma testosterone levels in male mice lacking soluble epoxide hydrolase.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. 297(2): p. E375-83.

174. McGiff, J.C. and J. Quilley, *20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings*. Am J Physiol, 1999. 277(3 Pt 2): p. R607-23.
175. Marković, M., *Regulation and enzymatic properties of renal cytochrome P450 isoforms*, in *Biologie, Chemie, Pharmazie* 2007, Freie Universität Berlin: Berlin.
176. Zhao, X., et al., *Decreased renal cytochrome P450 2C enzymes and impaired vasodilation are associated with angiotensin salt-sensitive hypertension*. Hypertension, 2003. 41(3 Pt 2): p. 709-14.
177. Holla, V.R., et al., *The kidney cytochrome P-450 2C23 arachidonic acid epoxygenase is upregulated during dietary salt loading*. J Clin Invest, 1999. 104(6): p. 751-60.
178. Okita, R.T. and J.R. Okita, *Cytochrome P450 4A fatty acid omega hydroxylases*. Curr Drug Metab, 2001. 2(3): p. 265-81.
179. Le Quere, V., et al., *Human CYP4F3s are the main catalysts in the oxidation of fatty acid epoxides*. J Lipid Res, 2004. 45(8): p. 1446-58.
180. Spector, A.A. and A.W. Norris, *Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. 292(3): p. C996-1012.
181. Carroll, M.A., et al., *Renal vasodilator activity of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid depends upon conversion by cyclooxygenase and release of prostaglandins*. J Biol Chem, 1993. 268(17): p. 12260-6.
182. Fulton, D., et al., *A method for the determination of 5,6-EET using the lactone as an intermediate in the formation of the diol*. J Lipid Res, 1998. 39(8): p. 1713-21.
183. Gilad, D., et al., *Paraoxonase 1 in endothelial cells impairs vasodilation induced by arachidonic acid lactone metabolite*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2019. 1864(3): p. 386-393.
184. Scheller, U., et al., *Oxygenation cascade in conversion of n-alkanes to alpha,omega-dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3*. J Biol Chem, 1998. 273(49): p. 32528-34.
185. Fang, X., et al., *20-carboxy-arachidonic acid is a dual activator of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. 82(1-4): p. 175-84.
186. Collins, X.H., et al., *Omega-oxidation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in cerebral microvascular smooth muscle and endothelium by alcohol dehydrogenase 4*. J Biol Chem, 2005. 280(39): p. 33157-64.
187. Carroll, M.A., et al., *Structural identification of cytochrome P450-dependent arachidonate metabolites formed by rabbit medullary thick ascending limb cells*. J Biol Chem, 1991. 266(19): p. 12306-12.
188. Loomba, R., et al., *Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis*. J Lipid Res, 2015. 56(1): p. 185-92.
189. Ivanov, I., et al., *Enantioselective substrate specificity of 15-lipoxygenase 1*. Biochemistry, 2004. 43(50): p. 15720-8.
190. Westphal, C., A. Konkel, and W.H. Schunck, *Cytochrome p450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated Fatty acids and their role in cardiovascular disease*. Adv Exp Med Biol, 2015. 851: p. 151-87.
191. Meckelmann, S.W., et al., *Comparison of derivatization/ionization techniques for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxylipins*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2017. 130: p. 8-15.
192. Wolfer, A.M., et al., *Development and Validation of a High-Throughput Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Approach for Screening of Oxylipins and Their Precursors*. Anal Chem, 2015. 87(23): p. 11721-31.
193. Yang, J., et al., *Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2009. 81(19): p. 8085-93.
194. Rund, K.M., et al., *Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3- and n6-PUFAs*. Anal Chim Acta, 2018. 1037: p. 63-74.
195. Ostermann, A.I., I. Willenberg, and N.H. Schebb, *Comparison of sample preparation methods for the quantitative analysis of eicosanoids and other oxylipins in plasma by means of LC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem, 2015. 407(5): p. 1403-14.

196. Chen, G.Y. and Q. Zhang, *Comprehensive analysis of oxylipins in human plasma using reversed-phase liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with heatmap-assisted selection of transitions*. *Anal Bioanal Chem*, 2019. 411(2): p. 367-385.
197. Aliwarga, T., et al., *Enzymatic and free radical formation of cis- and trans- epoxyeicosatrienoic acids in vitro and in vivo*. *Free Radic Biol Med*, 2017. 112: p. 131-140.
198. Roy, U., O. Loreau, and M. Balazy, *Cytochrome P450/NADPH-dependent formation of trans epoxides from trans-arachidonic acids*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. 14(4): p. 1019-22.
199. Jiang, H., et al., *Increases in plasma trans-EETs and blood pressure reduction in spontaneously hypertensive rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. 300(6): p. H1990-6.
200. Jiang, H., et al., *Hydrolysis of cis- and trans-epoxyeicosatrienoic acids by rat red blood cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. 326(1): p. 330-7.
201. Zeigler, M., et al., *A sensitive and improved throughput UPLC-MS/MS quantitation method of total cytochrome P450 mediated arachidonic acid metabolites that can separate regio-isomers and cis/trans-EETs from human plasma*. *Chem Phys Lipids*, 2018. 216: p. 162-170.
202. Yamanashi, H., et al., *Catalytic activities of mammalian epoxide hydrolases with cis and trans fatty acid epoxides relevant to skin barrier function*. *J Lipid Res*, 2018. 59(4): p. 684-695.
203. Roy, U., et al., *Stereospecific synthesis and mass spectrometry of 5,6-trans-epoxy-8Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. 15(12): p. 3029-33.
204. Roy, U., et al., *Cytochrome P450/NADPH-dependent biosynthesis of 5,6-trans-epoxyeicosatrienoic acid from 5,6-trans-arachidonic acid*. *Biochem J*, 2005. 390(Pt 3): p. 719-27.
205. Hartung, N.M., et al., *A strategy for validating concentrations of oxylipin standards for external calibration*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2019. 141: p. 22-24.
206. Capdevila, J.H., et al., *The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3*. *J Biol Chem*, 1996. 271(37): p. 22663-71.
207. Mosset, P., et al., *Arachidonate Epoxxygenase: Total synthesis of both enantiomers of 8,9- and 11,12- epoxyeicosatrienoic acid*. *Tetrahedron Letters*, 1986. 27(50): p. 6035-6038.
208. Falck, J.R., S. Manna, and J. Capdevila, *Enantiospecific synthesis of methyl 11,12- and 14,15- epoxyeicosatrienoate*. *Tetrahedron Letters*, 1984. 25(23).
209. Wang, L.L., et al., *Molecular Recognition and Chirality Sensing of Epoxides in Water Using Endo-Functionalized Molecular Tubes*. *J Am Chem Soc*, 2017. 139(25): p. 8436-8439.
210. Spector, A.A., *Arachidonic acid cytochrome P450 epoxxygenase pathway*. *J Lipid Res*, 2009. 50 Suppl: p. S52-6.
211. Mesaros, C., S.H. Lee, and I.A. Blair, *Analysis of epoxyeicosatrienoic acids by chiral liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using [13C]-analog internal standards*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010. 24(22): p. 3237-47.
212. Daikh, B.E., et al., *Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. 271(3): p. 1427-33.
213. Wu, S., et al., *Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxxygenase highly expressed in heart*. *J Biol Chem*, 1996. 271(7): p. 3460-8.
214. Lucas, D., et al., *Stereoselective epoxidation of the last double bond of polyunsaturated fatty acids by human cytochromes P450*. *J Lipid Res*, 2010. 51(5): p. 1125-33.
215. Kaspera, R. and R.A. Totah, *Epoxyeicosatrienoic acids: formation, metabolism and potential role in tissue physiology and pathophysiology*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009. 5(7): p. 757-71.
216. Groten, T., et al., *eNOS14 and EPHX1 polymorphisms affect maternal susceptibility to preeclampsia: analysis of five polymorphisms predisposing to cardiovascular disease in 279 Caucasian and 241 African women*. *Arch Gynecol Obstet*, 2014. 289(3): p. 581-93.

217. Vaclavikova, R., D.J. Hughes, and P. Soucek, *Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene, structure, function, and role in human disease*. *Gene*, 2015. 571(1): p. 1-8.
218. Wagner, K.M., et al., *Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for pain, inflammatory and neurodegenerative diseases*. *Pharmacol Ther*, 2017. 180: p. 62-76.
219. Hu, J., et al., *Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents diabetic retinopathy*. *Nature*, 2017. 552(7684): p. 248-252.
220. Morisseau, C., et al., *Effect of soluble epoxide hydrolase polymorphism on substrate and inhibitor selectivity and dimer formation*. *J Lipid Res*, 2014. 55(6): p. 1131-8.
221. Widstrom, R.L., A.W. Norris, and A.A. Spector, *Binding of cytochrome P450 monooxygenase and lipoxygenase pathway products by heart fatty acid-binding protein*. *Biochemistry*, 2001. 40(4): p. 1070-6.
222. Widstrom, R.L., et al., *Fatty acid-binding proteins inhibit hydration of epoxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase*. *Biochemistry*, 2003. 42(40): p. 11762-7.
223. Atshaves, B.P., et al., *Liver fatty acid-binding protein and obesity*. *J Nutr Biochem*, 2010. 21(11): p. 1015-32.
224. Wang, G., et al., *Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1*. *J Lipid Res*, 2015. 56(12): p. 2238-47.
225. Magdalou, J. and B.D. Hammock, *1,2-Epoxy cycloalkanes: substrates and inhibitors of microsomal and cytosolic epoxide hydrolases in mouse liver*. *Biochem Pharmacol*, 1988. 37(14): p. 2717-22.
226. Morisseau, C., et al., *Inhibition of microsomal epoxide hydrolases by ureas, amides, and amines*. *Chem Res Toxicol*, 2001. 14(4): p. 409-15.
227. Goswami, S.K., et al., *Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase or genetic deletion reduces diclofenac-induced gastric ulcers*. *Life Sci*, 2017. 180: p. 114-122.
228. Zeldin, D.C., et al., *Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. 330(1): p. 87-96.
229. Bieche, I., et al., *Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues*. *Pharmacogenet Genomics*, 2007. 17(9): p. 731-42.
230. Oh, S.F., T.W. Vickery, and C.N. Serhan, *Chiral lipidomics of E-series resolvins: aspirin and the biosynthesis of novel mediators*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1811(11): p. 737-47.
231. Serhan, C.N., et al., *Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing*. *J Exp Med*, 2000. 192(8): p. 1197-204.
232. Qu, Q., W. Xuan, and G.H. Fan, *Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation*. *Cell Biol Int*, 2015. 39(1): p. 3-22.
233. Isobe, Y., et al., *Stereochemical assignment and anti-inflammatory properties of the omega-3 lipid mediator resolvin E3*. *J Biochem*, 2013. 153(4): p. 355-60.
234. Ivanov, I., et al., *Molecular enzymology of lipoxygenases*. *Arch Biochem Biophys*, 2010. 503(2): p. 161-74.
235. Newcomer, M.E. and A.R. Brash, *The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis*. *Protein Sci*, 2015. 24(3): p. 298-309.
236. Coffa, G., C. Schneider, and A.R. Brash, *A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 338(1): p. 87-92.
237. Shishehbor, M.H., et al., *Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease*. *Free Radic Biol Med*, 2006. 41(11): p. 1678-83.
238. Thuresson, E.D., K.M. Lakkides, and W.L. Smith, *Different catalytically competent arrangements of arachidonic acid within the cyclooxygenase active site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 lead to the formation of different oxygenated products*. *J Biol Chem*, 2000. 275(12): p. 8501-7.

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACN	Acetonitril
AF	Vorhofflimmern
AKI	Akutes Nierenversagen
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ARF	Akutes ischämisches Nierenversagen
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Rinderserum-Albumin
CE	Kollisionsenergie
CHO	Cyclohexenoxid
CIP	Cahn-Ingold-Prelog
CIU	N-cyclohexyl-N'-(iodophenyl)urea
COX	Cyclooxygenase
CPB	Chlorperbenzoesäure
cPLA2	cytosolische PLA2
CPR	NADPH-CYP-Reduktase
CYP	Cytochrom P450
DHA	Dokosaheksäensäure
DHET	Dihydroxyeikosatriensäure
DHTL	$\delta$ -Lacton-Isomer von 5,6-EET
DiHDPA	Dihydroxydokosapentaensäure
DiHETE	Dihydroxyeikosatetraensäure
DiHOME	Dihydroxyoktadekensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC-APCI	Electron Capture Atmospheric Pressure Chemical Ionization
EDP	Epoxydokosapentaensäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEQ	Epoxyeikosatetraensäure
EET	Epoxyeikosatriensäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonooxid Synthase
EPA	Eikosapentaensäure
EPHX1	Genlokus der mikrosomalen Epoxid-Hydrolase
EPHX2	Genlokus der löslichen Epoxid-Hydrolase
EpOME	Epoxyoktadekensäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FABP	Fettsäure-Bindungsprotein
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FWHM	Full Peak Width At Half Maximum
GC	Gaschromatografie
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate

GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H/R	Hypoxie-Reoxygenierung
HDHA	Hydroxydokosahexaensäure
HEET	Hydroxyepoxyeikosatriensäure
HEPE	Hydroxyeikosapentaensäure
HETE	Hydroxyeikosatetraensäure
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HODE	Hydroxyoktadekadiensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
I/R	Ischämie-Reperfusion
IPK	Isolierte Perfundierte Niere
IS	Interner Standard
KO	Knockout
LLOQ	Lower Limit Of Quantitation
LOD	Limit Of Detection
LOX	Lipoxygenase
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
mEH	mikrosomale Epoxid-Hydrolase
MeOH	Methanol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
N <sub>2</sub> (l)	Flüssigstickstoff
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NP	Normalphasen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Prostaglandin
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Polysaccharid
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
QC	Quality Control
RP	Reverse-Phasen
RSD	Relative Standardabweichung
RV	Rotationsverdampfer
SD	Standardabweichung
sEH	lösliche Epoxid-Hydrolase
SEM	Standardfehler
SPE	Festphasenextraktion
THET	Trihydroxyeikosatriensäure
TPPU	N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidyl]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-urea]
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UNX	Uninephrektomie
WT	Wildtyp



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Aufnahme und Metabolismus der PUFAs bei Säugetieren und dem Menschen	3
Abbildung 1-2 Freisetzung von PUFAs und Metabolisierung zu Eicosanoiden	5
Abbildung 1-3 Zweikomponentensystem aus CYP und CPR am ER der Eukaryoten	6
Abbildung 1-4 CYP-vermittelte Bildung von Monohydroxiden und Monoepoxiden aus PUFAs	7
Abbildung 1-5 Zwei Wege der Bildung von 20-HEETs	8
Abbildung 1-6 Hydrolyse von Epoxy-Eicosanoiden	10
Abbildung 1-7 Phasen der I/R am Beispiel der Niere	11
Abbildung 1-8 Darstellung der Enantiomerie am Beispiel von 18-HEPE	15
Abbildung 1-9 Aufbau der MS/MS, schematisch	19
Abbildung 1-10 Chirale Selektoren und Interaktionsmodell von chiralen Polysaccharid-Phasen	20
Abbildung 3-1 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der warmen Ischämie/Reperfusion an Ratten [112]	47
Abbildung 3-2 Strukturformel des verwendeten EET-Analogs, bei dem es sich um ein Derivat von 14,15-EET handelt [120]	48
Abbildung 3-3 Renale Konzentration des EET-Analogs im I/R-Versuch	48
Abbildung 3-4 Verschiebung des CYP-AA-Eicosanoidmusters nach Ischämie, Reperfusion und Behandlung mit EET-Analog <i>in vivo</i>	49
Abbildung 3-5 Verschiebung des CYP-AA-Eicosanoidmusters nach Ischämie und Reperfusion bei männlichen und weiblichen Ratten <i>in vivo</i>	51
Abbildung 3-6 Schematischer Apparatur-Aufbau für die isolierte perfundierte Niere	52
Abbildung 3-7 Perfusionsdruck und Flussrate der IPK	53
Abbildung 3-8 IPK als stabiles Modell zur Untersuchung von Ischämie	54
Abbildung 3-9 Einfluss der Ischämie auf die Bildung von CYP-Eicosanoiden im IPK-Modell mit isolierten Nieren aus weiblichen und männlichen Ratten	55
Abbildung 3-10 CYP-Eicoanoide als mögliche prädiktive Biomarker für das Auftreten von post-operativer AKI	57
Abbildung 3-11 CYP-Eicoanoide als mögliche prädiktive Biomarker für das Auftreten von post-operativem Vorhofflimmern	58
Abbildung 3-12 Beeinflussung der Hydrolase-Aktivität durch sEH-Knockout	60
Abbildung 3-13 20-HEETs und 20-THETs bei renaler I/R an männlichen Ratten	62
Abbildung 3-14 20-HEETs und 20-THETs in Rattennieren im Modell der IPK	64
Abbildung 3-15 20-HEETs und 20-THETs im Plasma humaner Proben	65
Abbildung 3-16 Substituenten chiraler Phasen auf Polysaccharidbasis	67
Abbildung 3-17 Chirale Trennung von Monohydroxiden und Monoepoxiden auf Lux Amylose-1	68
Abbildung 3-18 Chirale Trennung von 14,15-EET in Abhängigkeit von Säule und organischer Komponente der mobilen Phase	70
Abbildung 3-19 Chirale Trennung kritischer Metaboliten	71
Abbildung 3-20 Schema der chiralen LC-ESI-MS/MS Analytik von biologischen Proben	74
Abbildung 3-21 Trennung von Monohydroxiden und Monoepoxiden durch Vorschalten einer achiralen Säule vor die chirale Phase	75
Abbildung 3-22 Repräsentative Chirale LC-ESI-MS/MS Chromatogramme	87
Abbildung 3-23 Stereoselektive Bildung von 17,18-EEQ und 18-HEPE durch humanes CYP1A1	89
Abbildung 3-24 Zeitverlauf der enantioselektiven Hydrolyse von 14,15-EET, 17,18-EEQ und 19,20-EDP durch	

murine sEH	90
Abbildung 3-25 Enantioselektive Hydrolyse von 8,9-EET durch sEH und mEH	91
Abbildung 3-26 Enantioselektive Hydrolyse von 11,12-EET durch sEH und mEH	92
Abbildung 3-27 Enantioselektive Hydrolyse von 14,15-EET durch sEH und mEH	93
Abbildung 3-28 Enantioselektive Hydrolyse von 17,18-EEQ durch sEH und mEH	94
Abbildung 3-29 Enantioselektive Hydrolyse von 19,20-EDP durch sEH und mEH	95
Abbildung 3-30 Hemmung der Diolbildung durch TPPU und CHO in Lebermikrosomen	97
Abbildung 3-31 Rolle der mEH bei der Bildung von EETs durch murine und humane Lebermikrosomen	98
Abbildung 3-32 Beeinflussung des endogenen Enantiomerenmusters durch sEH in Mäusen	99
Abbildung 3-33 Beeinflussung des Enantiomeren-Musters von 14,15-EET und 17,18-EEQ durch sEH in Mäusen	100
Abbildung 3-34 Beeinflussung des endogenen Enantiomerenmusters durch sEH in Mäusen	103
Abbildung 3-35 Profil der enantiomeren Eicosanoide in humanem Plasma	104
Abbildung 3-36 $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor-stimulierte stereospezifische Bildung von Monohydroxiden in humanen Vollblutproben	105
Abbildung 4-1 Sekundärmetabolismus von 8,9-EET und 20-HETE durch COX	110
Abbildung 4-2 Wirkung der CYP-AA-Eicosanoide und mögliche pharmakologische Eingriffe bei renalem I/R-Schaden	112
Abbildung 4-3 Wege des Sekundärmetabolismus* der CYP-AA-Eicosanoide	115
Abbildung 4-4 Postuliertes Schema möglicher Bildung, Wirkung und Inaktivierung endogener 20-HEETs in Ratten	116
Abbildung 4-5 Potentielle Störung der MS/MS-Analytik bei Regioisomeren	122
Abbildung 4-6 Potentielle Störung der MS/MS-Analytik durch cis/trans-Isomere	124
Abbildung 4-7 Schema der intrazellulären Hydrolyse von Monoepoxiden durch sEH und mEH	127
Abbildung 4-8 Modulation der Stereospezifität und Aktivität der sEH durch 11,12-EET	129
Abbildung 4-9 Bildung und postulierte Rolle von primär- und Sekundärprodukten des CYP-abhängigen AA-Metabolismus bei der Auslösung des ischämischen akuten Nierenversagens	133

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1-1 Rolle von CYP-Eicosanoiden in Modellsystemen des I/R-Schadens	13
Tabelle 1-2 Grundbegriffe der Massenspektrometrie	19
Tabelle 2-1 Enzymatische Synthese von HEETs mit Cyp4a12a - Mikrosomen im 4 ml – Ansatz	33
Tabelle 2-2 Retentionszeiten der AA-Metaboliten in der achiralen RP- und NP-HPLC	41
Tabelle 2-3 Retentionszeiten verschiedener Oxylipine in der achiralen LC-MS-Analytik	43
Tabelle 3-1 Auswirkungen des sEH-Knockouts auf das Eicosanoidprofil in Mäusen	61
Tabelle 3-2 Vergleich der Absolutlevel von 20-HEETs/THETs mit EETs/DHETs und 20-HETE bei renaler I/R an männlichen Rattennieren <i>in vivo</i> <sup>1</sup>	63
Tabelle 3-3 Vergleich der Absolutlevel von 20-HEETs/THETs mit EETs/DHETs und 20-HETE bei renaler Ischämie an männlichen Rattennieren im Modell der IPK <sup>1</sup>	64
Tabelle 3-4 Vergleich der präoperativen Absolutlevel von 20-HEETs/THETs mit EETs/DHETs und 20-HETE	

in klinischen Proben von Patienten mit postoperativem Auftreten von AKI und AF <sup>1</sup>	65
Tabelle 3-5 Retentionszeiten von AA- und EPA-Metaboliten in der chiralen LC-MS-Analytik (min)	72
Tabelle 3-6 Retentionszeiten von DHA- und LA-Metaboliten in der chiralen LC-MS-Analytik (min)	73
Tabelle 3-7 Messparameter MS/MS	77
Tabelle 3-8 Quality control (QC) Mixture <sup>1</sup>	78
Tabelle 3-9 Chromatografische Parameter der “Chiral-1” Methode	80
Tabelle 3-10 Chromatografische Parameter der “Chiral-2” Methode	81
Tabelle 3-11 Accuracy und Precision	83
Tabelle 3-12 Beschreibung der Matrixeffekte	85
Tabelle 3-13 Enantiospezifitäten muriner und humaner mEH und sEH in Bezug auf Racemate der CYP-Monoepoxide <sup>1</sup>	93
Tabelle 3-14 Chirales Eicosanoid-Profil in der Mausleber <sup>1</sup>	101
Tabelle 3-15 Chirales Eicosanoid-Profil in Mausplasma <sup>1</sup>	102

## Publikationsliste

Fachzeitschrift	Jahr	Autoren	Titel
Acta Physiologica	<i>in press</i>	Hoff,-U.; Bubalo, G.; Fechner, M.; <b>Blum, M.</b> ; Zhu, Y.; Pohlmann, A.; Hentschel, J.; Arakelyan, K.; Seeliger, E.; Flemming, B.; Gurgen, D.; Rothe, M.; Niendorf, T.; Manthati, V. L.; Falck, J.; Haase, M.; Schunck, W. H.; Dragun, D.	A SYNTHETIC EPOXYEICOSATRIENOIC ACID ANALOG PREVENTS THE INITIATION OF ISCHEMIC ACUTE KIDNEY INJURY
Journal of lipid research	2019	<b>Blum, M.</b> ; Dogan, I.; Karber, M.; Rothe, M; Schunck, WH.	Chiral lipidomics of monoepoxy and monohydroxy metabolites derived from long-chain polyunsaturated fatty acids.
Microbiology open	2018	Goloshchapova, K.; Stehling, S.; Heydeck, D.; <b>Blum, M.</b> ; Kuhn, H.	Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium <i>Myxococcus fulvus</i> exhibiting complex social living patterns.
American journal of physiology – Renal physiology	2018	Pahlitzsch, T.; Liu, ZZ.; Al-Masri, A.; Braun, D.; Dietze, S.; Persson, PB.; Schunck, WH.; <b>Blum, M.</b> ; Kupsch, E.; Ludwig, M.; Patzak, A.	Hypoxia-reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II.
American journal of physiology – Renal physiology	2016	Boldt, C.; Röschel, T.; Himmerkus, N.; Plain, A.; Bleich, M.; Labes, R.; <b>Blum, M.</b> ; Krause, H.; Magheli, A.; Giesecke, T.; Mutik, K.; Rothe, M.; Weldon, SM.; Dragun, D.; Schunck, WH.; Bachmann, S.; Paliege, A.	Vasopressin lowers renal epoxyeicosatrienoic acid levels by activating soluble epoxide hydrolase.
PloS one	2016	Zhu, Y.; <b>Blum, M.</b> ; Hoff,U.; Wesser, T.; Fechner, M.; Westphal, C.; Gürgen, D.; Catar,	Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Soluble Epoxide Hydrolase-Deficient

		RA.; Philippe, A.; Wu, K.; Bubalo, G.; Rothe, M.; Weldon, SM.; Dragun, D.; Schunck, WH.	Mice.
Acta Physiologica	2013	Kusch, A.; Hoff, U.; Bubalo, G.; Zhu, Y.; Fechner, M.; Schmidt-Ullrich, R.; Marko, L.; Müller, DN.; Schmidt-Ott, KM.; Gürgen, D.; Blum, M.; Schunck, WH.; Dragun, D.	Novel signalling mechanisms and targets in renal ischaemia and reperfusion injury.

## **Vorträge und Posterbeiträge**

<b>Ort</b>	<b>Jahr</b>	<b>Vortragstitel</b>
MDC Berlin-Buch	2014	Role of CYP-Eicosanoids in Ischemic Acute Kidney Injury
Phenomenex Aschaffenburg	2018	Entwicklung und Validierung einer chiralen LC-MS-Methode zur Bestimmung von Oxylinpin-Enantiomeren in biologischen Proben

<b>Konferenz</b>	<b>Jahr</b>	<b>Autoren</b>	<b>Postertitel</b>
6 <sup>th</sup> European workshop on lipid mediators, Frankfurt am Main, Germany	2016	M. Blum, M. Rothe, T. Wesser and W-H. Schunck	DEVELOPMENT OF A REVERSED PHASE CHIRAL LC- MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF MONOHYDROXY- AND EPOXYEICOSANOID ENANTIOMERS
16th Winter Eicosanoid Conference, Baltimore, Maryland, USA: Outstanding Poster Award	2016	M. Blum, M. Rothe, T. Wesser and W-H. Schunck	DEVELOPMENT OF A REVERSED PHASE CHIRAL LC/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF EPOXYEICOSANOID ENANTIOMERS
14 <sup>th</sup> Bioactive lipids in cancer, inflammation, and related diseases; Budapest, Hungary	2015	M. Blum, G. Bubalo, M. Fechner, U. Hoff, Y. Zhu, M. Rothe, J. R. Falck, D. Dragun, and W-H. Schunck	Role of CYP-eicosanoids in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury

## **Danksagung**

Dr. Wolf-Hagen Schunck gegenüber, sehe ich mich zu größtem Dank verpflichtet. Die enorme Wissenstiefe im Fachgebiet, der große qualitative Anspruch, sowie Geduld und Hilfsbereitschaft ermöglichten ein lehrreiches und gehaltvolles wissenschaftliches Arbeiten, ohne das eine Dissertation in dieser Form nicht zustande gekommen wäre.

Dr. Michael Rothe möchte ich vielfach danken, die analytischen Anlagen zur Umsetzung zahlreicher Vorhaben zur Verfügung gestellt und die Etablierung neuer analytischer Methoden kompetent begleitet zu haben. Ein herzliches Dankeschön richte ich weiterhin an Inci Dogan, sowie auch Heike Zweers und Christian Frätzer, die zur Umsetzung des neuen analytischen Verfahrens ebenso tatkräftig beigetragen haben. Für wertvolle Ratschläge möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Prof. Nils-Helge Schebb bedanken.

Ramona Zummach und Christel Andree möchte ich für das Arbeitsumfeld in sehr positiver Atmosphäre vielmals danken, ebenso auch ein großes Dankeschön an dieser Stelle, für die Unterstützung in der Labortätigkeit. Mirjam Karber danke ich vielmals in gleichem Sinne, ebenso auch Michael Öchsner, Julia Keller und allen weiteren Mitarbeiter\*innen der AG Schunck.

Vielmals danken möchte ich den Wissenschaftler\*innen der Charité Berlin für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen der DFG-Forschergruppe 1068. Frau Prof. Duska Dragun und Uwe Hoff leiteten die Versuchsplanungen mit unersetzlicher klinischer Expertise. Gordana Bubalo und Ye Zhu möchte ich für die vielen in sehr angenehmer Zusammenarbeit durchgeführten Versuche danken, und Mandy Fechner für das Einführen in tierexperimentelles Arbeiten. Weiterhin danke ich an dieser Stelle Prof. Hartmut Kühn und Prof. Andreas Patzak für die wertvolle Bereicherung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Ein großes Dankeschön möchte ich an die Omeicos GmbH richten, die durch Bereitstellung von Versuchsanlagen und wichtigen Materialien, sowie nicht zuletzt auch einer sehr angenehmen kollegialen Atmosphäre zu dieser Dissertation beigetragen hat. Herzlicher Dank gilt Saskia Reichert und Philipp Westphal außerdem für die Unterstützung bei der Durchführung von Tierversuchen, Tim Wesser für Zellkultur-Versuche, und Anne Konkel für die Zusammenarbeit bei Versuchen mit klinischen Proben.

Herzlich möchte ich Prof. Michael Bader für die Ermöglichung meiner Dissertation an der Humboldt-Universität Berlin danken, sowie für die kompetente Durchführung einer Vortragsreihe am MDC Berlin-Buch, die regelmäßig zur Inspiration für weiteres, tatkräftiges wissenschaftliches Arbeiten anregte.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut in Schrift und Bild, sowie Ergebnisse aus der Zusammenarbeit mit wissenschaftlichen Partnern, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Der Arbeit zugrunde liegen die Kooperation des MDC Berlins mit der Lipidomix GmbH Berlin, die durch das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) gefördert wurde (MDC; KF 2135009 und Dr. Michael Rothe; KF 2660402), sowie eine Kooperation mit der Charité Berlin, DFG-Forschergruppe 1068, Teilprojekt Dragun/Schunck.

Berlin, den 31.03.2019

Maximilian Blum